

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

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE MILHO
CRIOULO (*Zea mays ssp. mays*)**

**Paula Wiethölter
Bióloga/UPF**

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

**Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2005**

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar este curso e ao CNPQ pela bolsa.

À Professora Maria Jane Cruz de Melo Sereno pela orientação, amizade e ajuda diante das dificuldades que encontrei durante estes dois anos.

Ao Professor José Fernandes Barbosa Neto pela co-orientação, amizade, pela paciência e ajuda no campo e nas avaliações estatísticas.

Aos meus pais Sírio e Araci por terem me estimulado a estudar durante toda a minha vida.

Ao Ricardo pelo amor, amizade e por sempre ter me incentivado a lutar pelas coisas que eu quis.

Aos meus irmãos Daniela e André e ao meu cunhado Marcelo pelo companheirismo, apoio e amizade e ao Matheus, meu afilhado, que nasceu durante este curso me trazendo muitos momentos de alegria.

Aos meus colegas pela parceria nos momentos de diversão e de estudo e, principalmente, pela amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal pela ajuda diante dos desafios “moleculares”.

À Tati Terra pela sempre disposição em me ajudar e pela amizade demonstrada desde o começo.

Aos colegas Adriane e Leo pela ajuda e aos bolsistas Ian, Jaqueline, Priscila, Luciana e Gelson pela participação durante o desenvolvimento do trabalho.

À todos professores e funcionários do Pós-Graduação em Fitotecnia que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

As minhas colegas do apartamento Luiza, Patrícia e Precila pela convivência durante estes anos.

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE MILHO CRIOULO (*Zea mays* ssp. *mays*)¹

Autora: Paula Wiethölter

Orientadora: Maria Jane Cruz de Melo Sereno

RESUMO

O milho é uma das principais espécies cultivadas no mundo, e tem importância fundamental na alimentação de animais e humanos. Além disso, é considerado um dos cereais com maior variabilidade genética entre os cultivados, a qual é expressa nas diversas variedades crioulas existentes. Entretanto, para que toda esta variabilidade genética possa ser utilizada pelo melhoramento genético, é imprescindível o conhecimento do potencial genético destas raças. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram caracterizar diversas variedades crioulas de milho provenientes do sul do Brasil a nível fenotípico, molecular e citogenético e, com base nestes resultados, estimar a distância genética existente entre eles. Os marcadores moleculares utilizados neste trabalho foram microssatélites e AFLP. As análises morfológicas e moleculares demonstraram a existência de variação genética entre os genótipos avaliados, possibilitando o agrupamento de acordo com a distância genética existente entre eles. As análises citogenéticas indicaram a presença de poucas anormalidades nos grãos de pólen, as quais não comprometem o potencial reprodutivo dos genótipos. Estas informações podem contribuir significativamente com os programas de melhoramento que se dedicam a lançar genótipos com maior potencial agrônomo.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (77 p.). Fevereiro, 2005.

GENETIC VARIABILITY ANALYSIS IN MAIZE LANDRACES GENOTYPES (*Zea mays* ssp. *mays*)²

Author: Paula Wiethölter

Adviser: Maria Jane Cruz de Melo Sereno

ABSTRACT

Corn is one of the most important cultivated species in the world, and has fundamental importance in human and animal nutrition. Corn is also one of the cultivated species that present the largest genetic variability, presenting many landraces. To use these landraces in breeding programs it is necessary that they be well characterized genetically and agronomically. The objectives of this work were to analyze corn landraces from Southern Brazil, in terms of agronomic traits, molecular markers, and cytogenetic aspects, and then to estimate the genetic relationships among the landraces. The molecular markers used in this work were microsatellite and AFLP. The analysis of the agronomic traits and molecular markers showed that there was genetic variability among the landraces. It was possible to estimate the genetic distance among the genotypes. The results of the cytogenetic analyses indicated that some landraces presented abnormalities in the pollen, but this did not affected reproduction. The data obtained might contribute to corn breeding programs guided towards the development of specific plant types.

² Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (77 p.) February, 2005.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Evolução e domesticação do milho.....	04
2.2. Classificação Botânica.....	08
2.3. Variabilidade Genética.....	08
2.4. Caracterização Fenotípica.....	11
2.5. Caracterização Citogenética.....	12
2.6. Caracterização Molecular.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Avaliação de Fenotípica.....	22
3.2. Avaliação Molecular.....	26
3.2.1. Marcadores SSR.....	27
3.2.2. Marcadores AFLP.....	29
3.3. Avaliação Citogenética.....	30
3.3.1. Coleta, fixação e estocagem do material.....	30
3.3.2. Confeção das lâminas.....	30
3.3.3. Análises dos grãos de pólen.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Análises Fenotípicas.....	33
4.1.1. Estimativa da variabilidade genética.....	42
4.2. Análises Moleculares.....	47
4.2.1. Padrão dos SSR.....	47
4.2.2. Padrão dos AFLP.....	49
4.2.3. Divergência genética estimada pelos marcadores SSR e AFLP.....	50
4.3. Análises Citogenéticas.....	54
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Identificação dos genótipos de milho avaliados e locais de origem.....	23
2. Programas utilizados no termociclador.....	28
3. Primers de microssatélites usados na análise.....	28
4. Oligonucleotídeos usados na reação de AFLP.....	29
5. Genótipos avaliados quanto a viabilidade de pólen jovem e maduro e número de plantas avaliadas por genótipo.....	31
6. Resumo da análise de variância dos 13 caracteres avaliados nos 41 genótipos de milho crioulo, avaliados em Eldorado do Sul, 2003/2004.....	34
7. Análises descritivas dos caracteres agronômicos avaliados nos 41 genótipos de milho crioulo em Eldorado do Sul 2003/2004.....	36
8. Agrupamentos formados pelo Teste de Tukey.....	40
9. Análise de variância conjunta entre os dados coletados em Eldorado do Sul (RS) e Pelotas (RS), 2003/2004.....	42
10. Primers de SSR, locos, número de alelos por loco, tamanhos dos alelos e PIC.....	48
11. Número de locos encontrados por combinação de primers e tamanho das bandas.....	49
12. Viabilidade de pólen jovem e maduro em genótipos de milho crioulo.....	54

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Variabilidade observada através da cor do grão. A: Caiano Amarelo; B: Cinquentinha; C: Caiano Rajado; D: Amarelão.....	33
2. Agrupamento obtido pela matriz de distância genética, baseado na Distância Euclidiana (SAHN - NTSYS). Os números correspondem aos genótipos citados na Tabela 1.....	44
3. Agrupamento obtido pela matriz de distância genética, baseado no Coeficiente de Nei72 (SAHN - NTSYS).....	52
4. Grãos de pólen jovens de milho crioulo. A) Normal; B) Vazio; C) Forma anormal; D) Menor. Aumento 400 X.....	55
5. Grãos de pólen maduros de milho crioulo. A) Normal; B) Vazio; C) Forma irregular. Aumento: A e C: 400X; B) 100X.....	55

GLOSSÁRIO

RAPD: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.

NOR: Região Organizadora de Nucléolo

RFLP: Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

AFLP: Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados

SSR: Microsatélites

QTL: *Quantitative trait locus*

DNA: Ácido desoxirribonucléico

PCR: Reação da polimerase em cadeia

STS: *Sequence tagged sites*

GD: Graus dias

DP: Desvio padrão

pb: Pares de bases

PIC: Conteúdo de informação de polimorfismo

MDZ: linhas múltiplas dominantes de milho

MDE: linhas aloplásmicas em teosinto

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays ssp mays*) é uma das principais espécies cultivadas no mundo. Em 2002 ocupou a terceira posição mundial entre as mais cultivadas com, aproximadamente, 139 milhões de hectares (Bennett, 2004). Em 2003, no Brasil, foi cultivado em cerca de 13 milhões de hectares produzindo em torno de 48 milhões de toneladas. Desses, um milhão e meio de hectares foi cultivado no Rio Grande do Sul (RS), produzindo em torno de cinco milhões e meio de toneladas (IBGE).

O milho é hoje uma das principais fontes de alimento humano e animal, sendo consumido na forma *in natura* e industrializada. Na região Sul do Brasil, a produção é principalmente voltada à alimentação animal (aves e suínos), sob forma de ração. Dessa forma, o cultivo de milho não só no estado do RS, mas em todo o país é fundamental para o desenvolvimento da agroindústria brasileira.

É importante ressaltar que o milho é uma das espécies com maior variabilidade genética entre as cultivadas. Esta variabilidade é refletida, principalmente, na sua ampla adaptação a diversos ambientes. Além disso, existem os mais variados tipos de milho, os quais se originaram em função de diversas mutações e podem ser classificados em comum, doce, pipoca, entre

outros. A ampla variação existente na espécie é refletida nas inúmeras raças conhecidas, denominadas raças crioulas.

Atualmente as variedades crioulas são pouco cultivadas pelos produtores de milho, provavelmente devido ao baixo rendimento em relação aos híbridos disponíveis no mercado. Entretanto, alguns agricultores ainda mantém o seu cultivo principalmente pela produção da própria semente, sem necessidade da compra anual, como ocorre com a semente híbrida. Com isso, os programas de melhoramento genético têm a sua disposição o material genético necessário, e podem produzir variedades as quais normalmente tem um custo bem mais baixo para os agricultores com pequenas propriedades.

Há alguns anos, algumas instituições e Organizações Não Governamentais (ONGs) passaram a tentar recuperar a autonomia na produção de sementes aliada a melhorias na fertilidade do solo, visando com isso, elevar a produtividade e reduzir os custos de produção. Entretanto, para que as raças crioulas possam ser introduzidas nos programas elas precisam ser coletadas, identificadas e caracterizadas.

A disponibilidade de informações sobre o potencial genético das raças crioulas possibilita a manutenção de um banco de germoplasma que funciona como fonte de novas características em programas de melhoramento. Segundo Andrade et al. (2002), a coleção de germoplasma de milho do Brasil é uma das maiores do mundo, sendo conservada nos bancos de germoplasma da Embrapa (Brasil) e do Cimmyt (México).

Assim, é de suma importância a caracterização das raças crioulas existentes no Estado visando descobrir genótipos de excelente potencial produtivo além de caracteres singulares que possam ser introduzidos em

outras variedades através do melhoramento genético. É importante salientar ainda que, genótipos com características de interesse agrônômico também são utilizados nos programas de melhoramento para a criação de novas linhagens, posteriormente utilizadas no desenvolvimento de novos híbridos. 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 melhoramento no estabelecimento de estratégias de cruzamentos e seleção em programas de melhoramento de plantas.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o de analisar a variabilidade genética em populações de milho crioulo, através da caracterização fenotípica, molecular e citogenética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Evolução e Domesticação do Milho

Durante muitos anos, acreditava-se que este cereal era diplóide e que tinha evoluído por meio de seleção e através de recombinações entre genótipos (Mangelsdorf, 1974; Galinat, 1977; Goodman, 1978). Entretanto, hoje existem evidências de que o milho possui uma origem alotetraplóide, com $2n = 4x = 20$ cromossomos (Gaut et al., 2000) tendo o número básico de cromossomos de $x = 5$ (Molina et al., 1992; Poggio et al., 1997; White & Doebley, 1998). Segundo revisão de Poggio et al. (2000), três descobertas citológicas apóiam esta hipótese: a existência de pareamento cromossômico durante a meiose de haplóides, a associação secundária de bivalentes e a distribuição tridimensional em metáfases somáticas (onde os cromossomos formam quatro grupos de cinco cromossomos cada).

A idade estimada do milho é de 11 milhões de anos e o seu surgimento teria sido resultado de um evento de poliploidização que teria ocorrido após a divergência entre sorgo e milho sendo, portanto, considerado um poliplóide antigo (Gaut et al., 2000).

A verdadeira origem do milho ainda não foi completamente elucidada, porém existem alguns trabalhos indicando que o seu genitor seja *Zea mays* ssp. *mexicana* ou *Zea mays* ssp. *parviglumis*, ambos conhecidos como

teosintos (Galinat, 1977; Galinat, 1992; White & Doebley, 1998; Paabo, 1999; Paterniani & Campos, 1999; Takahashi et al., 1999; Wang et al, 1999; Piperno & Flannery, 2001).

Estas espécies são suspeitas de terem originado o milho pela presença de alguns caracteres em comum, como o mesmo número de cromossomos ($2n = 20$) e ainda por serem capazes de se cruzarem resultando em descendentes férteis na F1 (Goodman, 1995). Entretanto, Evans & Kermicle (2001) observaram a existência de um grupo de genes denominados *teosinte crossing barrier 1* (*Tcb1*), os quais restringem a compatibilidade nos cruzamentos entre milho e teosinto. Terra (2004) observou a existência de barreiras em nível genético entre milho e teosinto, o que impediu o desenvolvimento da geração F2. Contudo, quando a geração F1 é retrocruzada com milho, são obtidos descendentes férteis (Almeida, 2003).

Takahashi et al. (1999), utilizando a hibridização genômica in situ (GISH), avaliaram dez possíveis genitores do milho (*Z. mays* ssp. *mexicana* L., *Z. mays* ssp. *parviglumis* L., *Z. luxurians* L., *Z. diploperennis* L., *Z. perennis* L., *Tripsacum dactyloides* L., *Coix lachryma-jobi* L., *Sorghum bicolor* L., *S. versicolor* L. e *S. halapense* L.) e concluíram que, utilizando esta técnica, nenhuma destas espécies em particular poderia ser considerada um dos genitores diplóides do milho.

Existem ainda outras teorias sobre a origem do milho. Uma delas indica que a espécie genitora tenha sido extinta, outra que o milho cultivado teria origens múltiplas ou ainda que o milho, após a sua formação, tenha passado por inúmeras alterações gênicas, tornando impossível uma correlação positiva

de ancestralidade com qualquer espécie próxima (Takahashi et al., 1999; Poggio et al., 2000).

Uma das explicações para esta última teoria pode estar relacionada com a intensa presença de elementos transponíveis no genoma do milho. Segundo Kidwell (2002), 60 % do genoma do milho é constituído por elementos transponíveis. Estes são caracterizados como agentes móveis do genoma e apresentam a habilidade de induzir diversos rearranjos cromossomais tal como deleções, duplicações, inversões e translocações recíprocas (Zhang & Peterson, 1999), o que pode ter contribuído significativamente para a intensa diferenciação do milho em relação aos seus verdadeiros genitores (White & Doebley, 1998).

De fato, ainda não existe nenhuma informação conclusiva a respeito da real origem do milho cultivado. As especulações são muitas e com vários enfoques diferentes, mas ainda não se pode afirmar que o milho evoluiu a partir desta ou daquela espécie e, talvez, isso nunca poderá ser feito. Por um lado porque os seus genitores possam estar extintos e, por outro, porque o milho pode ter se diferenciado tanto após a domesticação, que não é possível nenhuma relação direta com outra espécie. Mas o que se pode afirmar é que dentre as espécies mais próximas do milho cultivado, *Z. mays ssp. parviglumis* é a mais relacionada.

Se *Z. mays ssp. parviglumis* realmente é um dos genitores do milho, é muito difícil entender como, em tão pouco tempo, o milho se diferenciou tanto. Segundo Hilton & Gaut (1998), seria um mecanismo evolutivo muito diferente do ocorrido entre *Z. mays ssp. parviglumis* e *Z. luxurians*, o qual estaria ocorrendo em um período de 100.000 anos, sendo acompanhado por uma

perda gradual de diversidade genética em *Z. luxurians*, levando a pouca divergência morfológica.

Mesmo que existam incertezas relacionadas a origem desta espécie, não existem dúvidas de que o milho é um cereal essencialmente americano (com origem no México), pois é neste continente que se encontram os seus parentes selvagens mais próximos, os quais incluem diversas espécies de teosintos e o *Tripsacum* (Paterniani & Campos, 1999).

Quanto a domesticação da espécie, existem evidências indicando que esta ocorreu entre 7.000 e 10.000 anos atrás (Doebley et al., 1994; White & Doebley, 1998), quando americanos nativos descobriram que eles podiam acelerar as forças da evolução natural, tornando o milho o principal cultivo de importantes civilizações como a dos astecas, maias e incas (Galinat, 1992; Machado & Paterniani, 1998; Paterniani & Campos, 1999). Piperno & Flannery (2001) encontraram vestígios de espigas e pólen de milho em Guilá Naquitz, no Vale Tehuacán (México) e concluíram que a data que deu início a domesticação do milho é anterior a 5.400 anos antes de Cristo. Entretanto, estas informações são insuficientes para indicar o local certo onde a domesticação da espécie começou e ainda, se esta começou em somente um local ou em vários locais distintos.

Dessa forma, é importante ressaltar que a domesticação do milho contribuiu efetivamente com o seu desenvolvimento evolutivo, como se a ação humana tivesse, aos poucos, moldado ou até mesmo construído uma espécie através da seleção de características importantes durante milhares de anos, o que resultou em uma espécie de grande importância econômica mundial, porém extremamente dependente do homem.

2.2 - Classificação Botânica

O milho é uma gramínea da família Poaceae e pertencente a tribo Maydeae. Caracteriza-se por ser anual e monóico, ou seja, apresenta flores unissexuadas, com inflorescências masculinas e femininas separadas na mesma planta, sendo considerada uma espécie com praticamente 100 % de alogamia. A tribo Maydeae é constituída por cinco gêneros asiáticos (*Coix*, *Schlerachne*, *Polytoca*, *Chionachne* e *Trilobachne*) e dois americanos (*Zea* e *Tripsacum*) (Russel & Hallauer, 1980; Goodman, 1995; Machado & Paterniani, 1998; Paterniani & Campos, 1999).

2.3 - Variabilidade Genética

O milho é uma espécie altamente variável. Quando uma espécie é domesticada, alelos de caracteres de interesse aumentam na freqüência, até serem fixados. Dessa forma, quando a seleção é fortemente exercida sobre uma espécie, a diversidade genética é drasticamente reduzida (Wang et al., 1999). Entretanto, Eyre-Walker et al. (1998) demonstraram que o milho apresenta 75 % da variação presente em *Z. mays* ssp *parviglumis*, um dos seus possíveis genitores, e é mais variável que *Z. luxurians*, um parente selvagem mais distante.

A ampla variabilidade genética permite que este cereal seja adaptado aos mais variados ambientes (Paterniani & Campos, 1999). A diversidade genética relacionada a fatores ambientais se deve ao fato de que o milho é cultivado em distintas condições de ambiente, desde o extremo norte ao extremo sul, baixas altitudes até altitudes superiores a 2.500 m (Teixeira et al., 2002).

Os primeiros escritores e exploradores apresentaram descrições variadas de tipos de milho cultivados em várias partes do Novo Mundo. As primeiras descrições sugeriam que o grão de milho era colorido e farináceo e com endosperma branco. Essas foram seguidas de muitas outras, desde grãos amarelos, alaranjados, até de endosperma duro e com variações de preto, vermelho ou roxo. Hoje, sabe-se que o milho varia de duro a dentado e que o amarelo é a coloração mais comum (Goodman, 1995). Segundo este mesmo autor, estas muitas formas diferentes de milho sugerem uma evolução independente, a partir de várias espécies ancestrais. Entretanto, Matsuoka et al. (2002), genotiparam com 99 microssatélites 264 plantas de diferentes genótipos coletados entre o Canadá e o Chile e, com seus resultados, excluíram a hipótese de origem múltipla do milho cultivado, ou seja, o milho possui uma única origem e diferenciou-se após a sua domesticação.

A variação genética presente na espécie é visualizada nas inúmeras raças de milho existentes. Segundo Galinat (1992), pela ampla adaptação geográfica e a distribuição do milho pelos agricultores, este se diferenciou em mais de 300 raças desde a época de Colombo.

De acordo com Harlan (1992), raças são tipos diferentes de populações de indivíduos dentro de uma mesma espécie, ou seja, as raças apresentam características particulares e normalmente apresentam nomes locais. Estas características podem estar relacionadas ao período de maturação (precoce ou tardio), características da espiga, fisiologia, genética e citogenética e até mesmo ao seu uso esperado (Wellhausen et al., 1951). Os indivíduos de uma raça são adaptados às condições climáticas locais, práticas culturais e a

doenças, entretanto, pode haver variação genética dentro da raça, principalmente por se tratar de uma espécie alógama.

Com a descoberta do Brasil, verificou-se a existência de diversas tribos indígenas que cultivavam milhos. Com o tempo, descobriu-se que cada tribo mantinha em cultivo tipos próprios deste cereal, que eram resultado de longos anos de seleção, objetivando atender às suas preferências quanto ao tipo de espiga, textura e coloração dos grãos utilizados para o preparo de alimentos e ainda para fins cerimoniais. Com a colonização pelo homem branco, este passou a plantar o milho cultivado pelos índios Tupi e Guarani, os chamados milhos Cateto e Cristal, respectivamente. Posteriormente, americanos emigraram para o Brasil trazendo consigo sementes de outras variedades, ocorrendo hibridações entre as raças locais, originando outros tipos de milho (Paterniani, 1998).

Além de servirem como fonte de variabilidade genética em programas de melhoramento, as variedades crioulas também são cultivadas pelos agricultores de pequenas propriedades que não querem ou não podem comprar sementes híbridas devido ao seu alto custo. Ao contrário das sementes híbridas, que necessitam ser adquiridas anualmente, sementes de variedades crioulas são produzidas pelos próprios agricultores, os quais plantam no ano seguinte as melhores sementes obtidas no ano anterior. Além disso, muitos agricultores realizam a troca de sementes entre si.

O conhecimento do potencial genético pode ser adquirido através da avaliação de caracteres fenotípicos e do uso de ferramentas biotecnológicas, as quais foram desenvolvidas para auxiliar no processo de melhoramento.

Dentre as ferramentas biotecnológicas, serão destacadas a citogenética e biologia molecular.

2.4 - Caracterização Fenotípica

A caracterização morfológica com o intuito de avaliar caracteres agronômicos e determinar a distância genética entre genótipos vem sendo empregada há muitos anos no melhoramento genético. Tem sido utilizada para estimar o relacionamento entre diferentes genótipos de milho, além de auxiliarem na classificação de raças e populações de milho (Camussi, 1979; Goodmam et al., 1988).

Entretanto, com o advento das técnicas moleculares, esta metodologia passou a ser usada com menor freqüência devido a influência ambiental e o menor número de marcadores gerados. Contudo, marcadores morfológicos podem ser muito úteis em estudos de variabilidade genética.

Souza e Sorrells (1991) avaliaram a distância genética entre cultivares de aveia através da análise de 13 caracteres quantitativos, tais como estatura, florescimento, peso de grão, entre outros. A partir dos resultados os genótipos foram separados em quatro grupos que corresponderam a sua latitude de origem (ou adaptação) com significativas diferenças entre os grupos para todos os caracteres. Concluíram que o agrupamento por morfologia poderia ser uma valiosa ferramenta para a identificação de genótipos com caracteres similares.

Melo et al. (2001) estimaram a divergência genética entre híbridos comerciais de milho através de 25 caracteres morfológicos e do marcador molecular RAPD. Observaram que ambos marcadores foram capazes de separar os genótipos, entretanto encontraram pouca correlação entre os

mesmos, concluindo que estes marcadores são distintos, mas complementares, ou seja, a utilização de um deles não substitui a necessidade de se avaliar o outro.

Andrade et al. (2002) caracterizaram e avaliaram a coleção de genótipos de milho armazenados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). Estes autores avaliaram diversos caracteres morfológicos e obtiveram agrupamentos de acordo com o tipo de endosperma. Observaram grande variabilidade fenotípica para todos os caracteres estudados. Estes resultados permitiram selecionar os acessos tanto para o melhoramento genético, quanto para a formação de novos compostos. Isto porque o agrupamento de genótipos induz a possíveis cruzamentos dentro do grupo com mais chances da obtenção de bons resultados. Resultados semelhantes foram obtidos por Teixeira et al. (2002) e Netto et al. (2002).

2.5 - Caracterização Citogenética

A citogenética é a ciência que estuda os cromossomos isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, no que se refere a sua morfologia, organização, função, replicação e ainda, em relação a sua variação e evolução durante a meiose e mitose (Guerra, 1988; Gill & Friebe, 1998).

No milho, a importância da análise da divisão meiótica está relacionada ao envolvimento de uma série de fenômenos mecânicos e bioquímicos complexos que estão associados à redução do número cromossômico. Cada etapa da divisão meiótica é controlada geneticamente e, para o desenvolvimento normal das plantas, a regulação da divisão celular é um

componente fundamental (Running et al., 2000), pois está diretamente relacionada com a fertilidade da planta.

A estabilidade meiótica está relacionada com a formação normal dos gametas masculino e feminino, o que garante uma perfeita polinização e formação de grãos de pólen. A análise da meiose nas células mães de pólen fornece informações quanto à presença ou ausência de anomalias, tornando possível a seleção de genótipos citologicamente mais estáveis para um programa de melhoramento. No final de década de 40, já existiam trabalhos buscando identificar problemas meióticos nos genótipos utilizados nos programas de melhoramento. Love (1949) avaliou o índice meiótico em cultivares de trigo do Rio Grande do Sul e observou várias anormalidades capazes de explicar os insucessos obtidos, na época, em alguns cruzamentos. A partir de então, diversos pesquisadores passaram a se dedicar às análises meióticas, como Manara & Manara (1974) em aveia e Del Duca & Moraes-Fernandes (1980) em trigo, entre tantos outros.

Dessa forma, análises citogenéticas são importantes para o melhoramento genético do milho, pois esta espécie pode apresentar inúmeras anormalidades ocasionadas por fatores distintos. Caetano-Pereira (1995) observou que genótipos cultivados em locais aos quais não estão adaptados podem apresentar diversas alterações citogenéticas, principalmente uma intensa fragmentação cromossômica. Estas alterações podem estar relacionadas com elementos transponíveis, os quais podem ser ativados em situações de estresse ambiental.

Caetano-Pereira & Pagliarini (1997) observaram que em alguns genótipos de milho pode ocorrer um evento chamado citomixia, que é a

passagem da cromatina do núcleo de uma célula mãe de pólen para o citoplasma de outra. As prováveis origens deste evento são a influência genética, formação anormal da parede celular durante as divisões pré-meióticas, ação de agentes químicos entre outros. Esses autores identificaram, entre os 36 genótipos analisados, cinco linhas híbridas e cinco híbridos duplos que foram afetados pela citomixia, a qual foi avaliada sob diferentes tipos de solos. Seus resultados sugeriram que a citomixia ocorreu por uma razão genética e que contribuiu na redução da viabilidade dos grãos de pólen.

A meiose é um evento de alta estabilidade evolutiva e, sendo o milho uma planta alógama, tem a regularidade meiótica assegurada. Entretanto, a endogamia pode levar a inúmeras anormalidades meióticas. Defani-Scoarize et al. (1996) avaliaram a meiose em linhas de milho desenvolvidas para posterior produção de híbridos. Estas linhas são desenvolvidas a partir de inúmeros ciclos de autofecundação. Observaram que as linhas apresentaram um grande número de anormalidades meióticas em todas as fases da meiose, produzindo tétrades e micrósporos anormais, comprometendo, dessa forma, a viabilidade do pólen.

Almeida (2003) realizou hibridações artificiais entre milho comum, milho doce e teosinto e observou a presença de anormalidades meióticas nos híbridos como a presença de univalentes, aderência cromossômica, dessinápse em metáfase I e pontes em anáfase I. Contudo, estas anormalidades não reduziram a produção de grãos de pólen viáveis.

Os cromossomos no milho apresentam uma estrutura muito característica da espécie, os chamados “knob”. Estes knobs são nódulos formados por heterocromatina adicional e não são constantes dentro da

espécie, não apresentando nenhuma função conhecida no genoma onde ocorrem. Contudo, serviram como objeto para estudos envolvendo a origem do milho, pois espécies próximas também os apresentam como teosintos e *Tripsacum* (Reeves & Mangelsdorf, 1942; Galinat, 1977; Aguiar-Perecin, 1987; Poggio et al., 2000).

É importante ressaltar que os knobs funcionam perfeitamente bem na classificação de raças dentro da espécie. Sachan & Nath (1994) analisaram a elasticidade e a resistência de espigas em sete raças de milho, relacionado a diferentes números de knobs. Constataram que espigas macias e flexíveis estavam associadas com um baixo número de knobs. Em um estudo de hibridização *in situ* utilizando diferentes linhas de milho, constatou-se que a distribuição, número e tamanho dos knobs é altamente variável (Poggio et al., 2000). Dessa forma, pode-se dizer que o conhecimento dos knobs nas diversas variedades ou raças de milho pode servir tanto para estudos relacionados a análises evolutivas, como um marcador na determinação de raças.

Além da presença de knobs, os cromossomos do milho também apresentam, segundo revisão de Aguiar-Perecin et al. (2000), heterocromatina adjacente aos centrômeros, heterocromatina da região organizadora de nucléolo (NOR), cromossomos B e ainda anormalidade no cromossomo 10. Também relataram que o maior componente do knob nos cromossomos de milho é uma unidade repetitiva de 180 pares de bases, com algum nível de variação.

Contudo, devido aos grandes problemas que as anormalidades meióticas podem provocar em uma planta, Chang & Neuffer (1989) analisaram detalhadamente a microsporogênese em milho, correlacionando as fases com

características do pendão. Observaram a existência de uma relação entre mudanças morfológicas no comprimento do pendão, florete e antera com seis estádios definidos da microsporogênese, que são: pré-meiose, meiose, estágio uninucleado, 1ª mitose do pólen, 2ª mitose do pólen e pólen maduro.

A análise de grãos de pólen é uma ferramenta de grande importância em programas de melhoramento, pois indica o potencial reprodutivo que a planta pode ter. Existem diversos fatores que podem intervir na viabilidade dos grãos de pólen, como o uso de agrotóxicos (Serenó, 1981; Smith & Moser, 1985; Sari-Gorla et al., 1994), altas temperaturas (Bodanese-Zanettini et al., 1979; Rodriguez-Garay & Barrow, 1988), baixas temperaturas (Zamir et al., 1982; Zamir & Gadish, 1987), altas concentrações salinas (conforme revisão de Hormaza & Herrero, 1992), entre outros. Por isso, grãos de pólen podem ser usados com sucesso na seleção de indivíduos tolerantes.

A análise da viabilidade de grãos de pólen é uma importante ferramenta no melhoramento genético, pois informa o potencial reprodutivo das plantas. Sendo assim, este tipo de análise é muito importante em estudos visando avaliar variabilidade genética, onde se busca identificar genótipos e caracteres de interesse.

2.6 - Caracterização Molecular

No que se refere a biologia molecular, diversas técnicas estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética objetivando detectar polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo e podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de

genética como em melhoramento de plantas (Tanksley et al., 1989; Tanksley, 1993).

Existem diversas técnicas para marcadores moleculares, que são: RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) e microssatélites (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Melo et al., 2001; Benchimol et al., 2001).

A análise da divergência genética visa agrupar os genitores mais divergentes, objetivando, após o cruzamento, maximizar a heterose. Na cultura do milho, encontrou-se forte associação entre a divergência genética obtida por marcadores moleculares e a obtida por meio de caracteres agronômicos, sendo que uma não substitui a outra, ou seja, funcionam de maneira complementar (Melo et al., 2001). Porém, em um estudo em milho doce objetivando avaliar o grau de associação entre marcadores microssatélites (SSR – “Simple Sequence Repeats”) e caracteres agronômicos, através de um teste de correlação, descobriu-se que estes marcadores são pouco correlacionados (Amorim et al., 2003).

Benchimol et al. (2001) avaliaram quatro tipos de marcadores (RFLP, RAPD, AFLP e SSR) para identificar a diversidade genética entre linhagens de milho e constataram que o conteúdo de informação dos marcadores codominantes (RFLP e SSR) foi superior ao dos dominantes (RAPD e AFLP). Ainda observaram que o número mínimo de locos para os marcadores codominantes está em torno de 100, enquanto que para os dominantes, este valor é de cerca de 400. Segundo revisão de Pejic et al. (1998), locos microssatélites são marcadores co-dominantes mais informativos que RAPD e

RFLP. Resultado semelhante foi obtido por Taramino & Tingey (1995), em análise comparativa entre marcadores RFLP e SSR, onde concluíram que marcadores SSR são mais informativos que marcadores RFLP e podem ser usados como uma ferramenta para análise de espécies altamente polimórficas como o milho. Para Senior (1993), os SSRs constituem uma ferramenta importantíssima em estudos de genética do milho. Além disso, existe um grande número de seqüências de pares de primers SSR disponíveis no Maize Genome Database (www.agron.missouri.edu/ssr.html).

A utilização de marcadores moleculares também tem possibilitado o mapeamento de diversos caracteres de importância agrônômica em várias espécies (Beavis et al., 1991). Com as diferentes técnicas de mapeamento, tem sido possível determinar a localização dos genes de herança quantitativa e qualitativa que governam os caracteres de interesse. 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).

Os microssatélites (SSR) são seqüências curtas com um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em tandem ao longo da molécula de DNA, as quais são flanqueadas por seqüências conservadas. Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, com um elevado conteúdo informativo de polimorfismo e apresentando-se estável ao longo das gerações (Taramino & Tingey, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Sharopova et al., 2000; Padilha et. al., 2002).

Analisando a evolução dos SSRs, Li et al. (2002) desenvolveram um esquema para demonstrar as possíveis funções do microssatélites e os seus

efeitos, dividindo-os em três 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.

Em plantas, os sítios de SSRs são largamente distribuídos com uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases. Estão presentes em 34 espécies vegetais, sendo que o elemento mais comum é o di-nucleotídeo AT. As regiões contendo as seqüências simples repetidas são amplificadas através de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), utilizando-se um par de “primers” específicos (20 a 30 pares de bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o SSR. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente 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, nitrato de prata ou através de autoradiografia, utilizando primers marcados com radioisótopos na reação de PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Em um estudo objetivando identificar o grau de transferibilidade de marcadores moleculares SSR e marcadores STS (Sequence Tagged Sites) desenvolvidos para diferentes espécies, Magalhães et al. (2002) concluíram que os marcadores STS apresentaram o maior número de bandas amplificadas, e podem ser utilizados em estudos de conservação entre genomas de diferentes espécies de gramíneas como arroz, cana-de-açúcar, milho, trigo, sorgo, aveia, cevada, braquiária e bambu. Porém, têm baixa

capacidade de detectar os alelos diferentes de indivíduos heterozigotos para determinada região genômica. Já os marcadores SSR, que possuem alto grau informativo, são mais indicados para detectar polimorfismo, importante na análise da diversidade genética, construção de mapas de ligação, etc.

Para Lubberstedt et al. (1998), SSRs são mais úteis para detectar variabilidade genética em genótipos proximamente relacionados do que para espécies geneticamente mais distantes, comparados com RFLP. Porém, são amplamente utilizados para os mais diversos estudos em nível de DNA.

Diversos trabalhos têm sido publicados demonstrando a eficácia no uso de marcadores SSR visando caracterizar a variabilidade genética existente entre diferentes genótipos ou grupos raciais. Dentre eles estão Reif et al. (2003) e Reif et al. (2004), em populações tropicais de milho, Bodak et al. (2003), com milheto e Prasad et al. (2000) em trigo. Carvalho et al. (2002), encontraram resultado similar analisando a variabilidade genética em raças de milho crioulo, utilizando marcador do tipo RAPD.

Contudo, marcadores AFLP também podem ser muito úteis em estudos de variabilidade genética. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), este marcador representa a tecnologia mais recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. É um marcador que combina a especificidade da digestão com enzimas de restrição com a praticidade e velocidade de detecção dos polimorfismos via PCR. De acordo com os mesmos autores, as principais vantagens desta técnica são o grande número de fragmentos por gel e o grande poder de detecção de variabilidade genética. Já a principal limitação é o

baixo conteúdo de informação genética por loco, pois são marcadores dominantes.

Segundo Mueller & Wolfenbarger (1999), os marcadores AFLP têm mostrado serem úteis para verificar diferenças genéticas entre indivíduos, populações, linhagens e espécies.

Pejic et al. (1998) avaliaram a informatividade e aplicabilidade dos marcadores SSR, AFLP, RFLP e RAPD em 33 linhas em milho. Detectaram que os SSR apresentaram o maior número de alelos, enquanto que os AFLP apresentaram o menor. Contudo, o AFLP foi o marcador mais eficiente pela sua capacidade em revelar diversas bandas em uma única amplificação. Também avaliaram a similaridade genética existente entre as linhas e observaram forte correlação dos resultados entre os marcadores SSR, RFLP e AFLP, exceto para RAPD. Concluíram que marcadores SSR e AFLP podem substituir o marcador RFLP em estudos de similaridade pela sua acurácia em genotipar linhagens selecionadas pelo pedigree.

Desta maneira, marcadores moleculares são ferramentas importantes e podem contribuir com informações sobre a variabilidade genética dentro de uma espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para que fosse possível a investigação da variabilidade genética entre as raças de milho crioulo empregando técnicas de análises fenotípicas, moleculares e citogenéticas, o experimento foi dividido em três partes:

3.1 - Avaliação Fenotípica

Este experimento foi realizado na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA), localizada no município de Eldorado do Sul/RS. A semeadura foi realizada em outubro de 2003. Foram avaliados 37 genótipos de milho crioulo provenientes de diversas regiões do Estado do Rio Grande do Sul, cedidas pela Embrapa Clima Temperado (CPACT - Pelotas/RS) e pela FEPAGRO (Veranópolis/RS), e quatro testemunhas. As testemunhas foram constituídas por duas populações melhoradas e dois híbridos comerciais. Os genótipos avaliados estão dispostos na Tabela 1.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições. Em cada bloco havia uma parcela por genótipo, sendo que cada parcela constava de duas linhas de 5 m, separadas por 0,7 m.

TABELA 1. Identificação dos genótipos de milho avaliados e locais de origem.
Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Local de coleta	Tipo de grão	Cor do grão
1	8 Carreiras Branco	Herval D'Oeste	D	BR
2	Cultivar Brancão	Ibarama	D	BR
3	Cinquentinha	Ibarama	D	BR
4	Pururuca Branco	Arroio do Tigre	F	BR
5	Ferro	Ibarama	F	LA
6	Amarelão	Salto do Jacuí	D	AM
7	8 Carreiras Amarelo	Arroio do Tigre	D	AM
8	Dente de Cão	Pejuçara	D	AM
9	Bico de Ouro	Ibarama	D	LA
10	Cunha	Paim Filho	D	AM
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	Frederico Westphalen	D	AM
12	Brasino	Ibarama	D	VE
13	Cabo Roxo	Barra Velha	SD	MISTO
14	BR – 451 (Testemunha 1)	Pelotas	SD	BR
15	Açoriano Branco	São José do Norte	F	BR
16	Branco Duro	Canguçu	F	BR
17	POP – 5 (estaca 44)	Pelotas	F	BR
18	POP – 5 (estaca 21)	Pelotas	F	BR
19	Assis Brasil (estaca 31)	Pedras Altas	F	LA
20	Amarelão Comum	Pelotas	D	LA
21	Assis Brasil (estaca 16)	Pedras Altas	F	LA
22	Colonial (Santa Eulália - 1)	Pelotas	SF	LA
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	Pelotas	F, SD	RX
24	Colonial Vermelho	Três Arroios	F, D	RX
25	Caiano Branco	Pejuçara	D	BR
26	Branco Argentino	Canguçu	F	BR
27	Argentino Flint	Canguçu	F	LA
28	Dente de Ouro	Canguçu	D	AM
29	Catete Amarelo	Canguçu	D	AM
30	Roxo Índio	Canguçu	F, SD, D	RX
31	Caiano Rajado	Canguçu	D	RJ
32	Pampa (Testemunha 2)	Pelotas	D	MISTO
33	Cabo Roxo Misto	Ibarama	D	RX
34	Comum Amarelo	Barra Funda	D	AM
35	Cunha	Osório	D	AM
36	Cunha Sabugo Duplo	Passo Fundo	D	AM
37	Cunha Sabugo Fino	Sto Antônio do Palma	D	AM
38	Caiano Amarelo	Porto Lucena	D	AM
39	Sabuguinho Amarelo	Candelária	D	AM
40	NB 3311 (Testemunha 3)	Eldorado do Sul	*	*
41	TORK (Testemunha 4)	Eldorado do Sul	*	*

D: dentado; F: flint; SD: semi-dentado; SF: semi-flint; BR: branco; LA: alaranjado; RX: roxo; RJ: rajado; AM: amarelo; * Sem dados.

Em torno de 20 dias após a semeadura foi realizado o desbaste, deixando somente uma planta por cova, com espaçamento de 20 cm. No estágio de 4 a 8 folhas foi realizada a aplicação de Nitrogênio (N), estimando-se 100 Kg de N/ha.

Os caracteres fenotípicos avaliados foram:

1) Número de plantas germinadas na parcela: contagem do número de plantas germinadas na parcela 15 dias após a semeadura.

2) Graus dias para o florescimento feminino, obtido pela fórmula:

$GD = \sum (T_{\text{média}/\text{dia}} - 10)$, onde:

GD = graus dia

\sum = somatório

$T_{\text{média}/\text{dia}}$ = Temperatura média do dia, obtida pela fórmula:

$T_{\text{média}} = \frac{T_{\text{máxima}} - T_{\text{mínima}}}{2}$

2

10 = temperatura mínima para o milho se desenvolver

O somatório dos graus dias foi realizado desde a data da semeadura até o aparecimento dos estigmas em pelo menos metade dos indivíduos da parcela. As temperaturas máximas e mínimas entre a semeadura e as avaliações, que permitiram a quantificação dos graus dias foram cedidas pelo Professor Homero Bergamaschi, do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS.

3) Graus dias para o florescimento masculino: obtido da mesma maneira citada para o florescimento feminino. Entretanto, o somatório dos graus dias foi realizado desde a data da semeadura até a liberação do pólen (ou abertura das anteras) em pelo menos metade dos indivíduos da parcela.

- 4) Estatura de planta: obtida através de uma medida linear em centímetros da base da planta até a primeira ramificação do pendão.
- 5) Altura de inserção de espiga: obtida pela medida linear em centímetros da base da planta ao ponto de inserção da espiga superior.
- 6) Acamamento: avaliação do percentual de plantas da parcela que apresentaram sintoma visual de acamamento.
- 7) Quebramento: avaliação do percentual de plantas da parcela que apresentaram sintoma visual de quebramento.
- 8) Número de espigas por parcela.
- 9) Percentual de espigas doentes (podres) por parcela.
- 10) Rendimento das espigas: pesagem das espigas da parcela, com correção de 13 % da umidade.
- 11) Rendimento de grãos: pesagem dos grãos da parcela, com correção de 13 % da umidade.
- 12) Peso de grão: estimativa do peso de um grão em cada genótipo.
- 13) Comprimento da espiga: avaliação realizada aleatoriamente em quatro espigas por parcela, onde se mediu o comprimento em centímetros.
- 14) Diâmetro da espiga: avaliação realizada aleatoriamente em quatro espigas por parcela, onde se mediu o diâmetro de cada espiga, em centímetros.
- 15) Número de fileiras de grãos: avaliação realizada aleatoriamente em quatro espigas por parcela, onde se realizou a contagem de fileiras de grãos por espiga.
- 16) Estande final: número final de plantas por parcela.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (SAS Institute, 2000). Para estimar a distância

genética entre os genótipos, foi utilizada a Distância Euclidiana através do programa NTSYS (Rohlf, 2000).

O ensaio desenvolvido na EEA em Eldorado do Sul também foi realizado na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS), sob responsabilidade do pesquisador Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva, com o objetivo de avaliar a interação genótipo X ambiente. O germoplasma avaliado foi constituído pelos 32 primeiros genótipos citados na Tabela 1. As características analisadas foram: estatura de planta, altura de inserção de espiga, acamamento, quebramento e rendimento de grãos. Os resultados foram submetidos à análise de variância.

3.2 – Avaliação Molecular

A avaliação molecular foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, localizado no Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Foram avaliados os 41 genótipos já citados na Tabela 1 e ainda uma população de teosinto.

O material para análise molecular foi extraído do experimento realizado na EEA em Eldorado do Sul. Foram coletadas folhas de 20 plantas por genótipo, as quais foram conservadas em sacos plásticos contendo sílica para desidratar o material. A conservação em sílica é um método muito eficiente para a manutenção da integridade do DNA em longo prazo, além de ser um método muito seguro para a coleta em locais distantes do laboratório. O teosinto, apenas utilizado na análise molecular como testemunha de distanciamento genético, foi cedido pela Embrapa Centro de Pesquisa Agrônômica de Clima Temperado (Pelotas, RS) sob forma de DNA estocado.

O protocolo utilizado para a extração de DNA foi o de Murray & Thompson (1980). O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 0,9 % e as soluções de trabalho de DNA foram elaboradas na concentração de 10ng/μl. Os marcadores moleculares avaliados foram do tipo SSR e AFLP.

3.2.1 - Marcadores SSR

As reações de SSR foram preparadas para um volume de 20 μl. Cada reação continha: 10,2 μl de água esterilizada, 2 μl de Tampão 10 X (Invitrogen), 0,6 μl de MgCl₂ (Invitrogen), 0,4 μl de dNTP mix (Invitrogen), 0,3 μl do primer F (forward), 0,3 μl do primer R (reverse), 0,2 μl da enzima Taq-DNA Polimerase (Invitrogen, 5u/μl) e 6 μl de DNA (solução de trabalho).

As amplificações foram realizadas em termociclador (modelo: PTC – 100, MJ Research, Inc.). Para a amplificação do DNA genômico foi utilizado um programa do tipo Touchdown (Tabela 2). O marcador DNA Ladder - 100 pb (Invitrogen) foi utilizado como padrão de peso molecular.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose 3 %, com migração de 3 horas em cuba horizontal. Os fragmentos foram marcados com brometo de etídeo, visualizados em luz ultravioleta e fotografados pelo programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1. Foram testados 64 primers dos quais 23 apresentaram bom padrão molecular. Os primers avaliados estão dispostos na Tabela 3.

As avaliações realizadas foram: número de alelos por loco e estimativa do conteúdo de polimorfismo (PIC), obtido através da fórmula: $PIC = 1 - \sum p_u^2$, onde p_u é a frequência do alelo u .

TABELA 2. Programas utilizados no termociclador. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Programa	Etapas
Touchdown	18 ciclos de 94 °C por 1 minuto, seguido de um decréscimo de 1 °C a cada dois ciclos (64 °C a 55 °C) e 72 °C por um minuto. Soma-se ainda 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por um minuto e 72 °C por um minuto.
Pré-Amplificação	94 °C por 3 minutos 94 °C por 30 segundos 56 °C por 1 minuto 72 °C por 1 minuto 20 ciclos
Amplificação Seletiva	94 °C por 3 minutos 94 °C por 1 minuto 65 °C por 1 minuto** 72 °C por 1 minuto e 30 segundos **inicia com 65 °C e diminui sucessivamente até 56 °C, seguindo nessa temperatura por 23 ciclos.

TABELA 3. Primers de microssatélites usados na análise. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Número	Primer	Loco	Cromossomo	Seqüência Repetida
1	umc 1547	Sterol methyl transferase 2	1.01	(TCT)5
2	umc 1026	Loco umc1026	2.04	(CT)9
3	umc 1696	Loco umc1696	2.10	(GA)8
4	umc 1683	Loco umc1083	3.04	(CT)6
5	phi 073	Glutathione-s-transferase	3.05	AGC
6	umc 1594	Loco umc1594	3.10	(TA)10
7	umc 1294	Loco umc1294	4.02	(GAG)4
8	nc 004	Alcohol deshydrogenase2	4.03	AG
9	phi 074	Zein protein 22.1	4.04	CAA
10	umc 1173	Histone deacetylase homolog	4.09	(AC)7
11	umc 1197	Catalase 3	4.11	AT
12	umc 1097	Loco umc1097	5.00	(CA)8
13	umc 1056	Peroxidase 13	5.03	(AGCA)4
14	umc 1341	Replication origin activator 2	6.05 - 6.06	(CTGT)4
15	umc 1545	Heat shock protein 3	7.00	(AAGA)4
16	umc 1433	Loco umc1433	7.02	(AG)6
17	umc 1627	Oxygen evolving complex 23	8.03	(GTAC)4
18	umc 1172	Pyruvate decarboxylase 1	8.04	(CAA)4
19	umc 1636	Loco umc1636	9.02	(ACTGC)4
20	phi 065	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	9.03	CACTT
21	phi 016	Sucrose synthase 1	9.04	GGT
22	phi 032	Sucrose synthase 1	9.04	AAAG
23	umc 1648	Loco umc1648	10.04	(TC)8

3.2.2 - Marcadores AFLP

As reações de AFLP foram realizadas seguindo o protocolo constituído de seis passos: digestão com enzima de restrição Mse 1, digestão com enzima de restrição Pst 1, inativação das enzimas, ligação dos adaptadores, pré-amplificação e amplificação seletiva. Os últimos dois passos foram realizados em termociclador e suas etapas estão dispostas na Tabela 2.

A amplificação seletiva foi realizada utilizando três combinações diferentes de primers. Todos os oligonucleotídeos utilizados na reação de AFLP estão dispostos na Tabela 4.

TABELA 4. Oligonucleotídeos usados na reação de AFLP. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Tipo	Código	Seqüência
Adaptadores	Pa 1.1	5' – GAC TGC GTA GGT GCA – 3'
	Pa 1.2	5' – CCT ACG CAG TCT ACG AG – 3'
	Ma 1.1	5' – GAC GAT GAG TCC TGA G – 3'
	Ma 1.2	5' – TAC TCA GGA CTC AT – 3'
Pré-Amplificação	M + C	5' – GAT GAG TCC TGA GTA AC – 3'
	P + A	5' – GAC TGC GTA GGT GCA GA – 3'
Amplificação Seletiva	P1= P + AAA	5' – GAC TGC GTA GGT GCA G AAA – 3'
	M1= M + CAC	5' – GAT GAG TCC TGA GTA A CAC – 3'
	M2 = M + CAG	5' – GAT GAG TCC TGA GTA A CAG – 3'
	M3 = M + CCG	5' – GAT GAG TCC TGA GTA A CCG – 3'
	M4 = M + CGA	5' – GAT GAG TCC TGA GTA A CGA – 3'

A separação dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de acrilamida 6 %, com migração de 4 h em cuba vertical. Para a visualização dos fragmentos utilizou-se nitrato de prata.

Foi quantificado o número de locos gerados por combinação de primer.

Para estimar a diversidade genética, foi calculada a distância genética de NEI (1972), utilizando os dados SSR e AFLP, os quais foram utilizados para gerar o dendograma através do procedimento SAHN do aplicativo NTSYS

(Rohlf, 2000). Em seguida, foi verificada a correlação entre os marcadores moleculares e morfológicos.

3.3 - Avaliação Citogenética

As análises para estudos de viabilidade dos grãos de pólen foram realizadas no Laboratório de Citogenética, localizado no Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Foram seguidos os seguintes passos:

3.3.1 - Coleta, fixação e estocagem do material:

O material foi coletado em dezembro de 2003, na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS (Eldorado do Sul/RS).

No período de florescimento, foi coletado o número máximo de inflorescências (pendões) próximas a fase de antese disponíveis por genótipo. O material foi fixado em solução Carnoy (álcool etílico e ácido acético, 3:1, respectivamente) e mantido nesta solução por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente foi transferido para solução de álcool 70 % e mantido a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a confecção das lâminas para as análises.

3.3.2 - Confecção das lâminas

A verificação da viabilidade do pólen foi realizada através da confecção de lâminas utilizando o corante carmim propiônico 0,6 %. Três anteras de cada flor foram colocadas sob a lâmina, sob a qual pingou-se uma gota de corante. As anteras foram separadas e levemente esmagadas com auxílio de uma lanceta. Foram retirados os fragmentos maiores das mesmas com auxílio de

uma pinça, mantendo sobre a lâmina apenas o corante os grãos de pólen. Em seguida foi colocada a lamínula e, com auxílio de papel filtro, foi retirado o excesso de corante. As lâminas foram seladas com luto (breu e cera de abelha na proporção 1:1), identificadas e observadas ao microscópio.

3.3.3 - Análises dos grãos de pólen

Foram analisados 200 grãos de pólen por lâmina. Os gametas masculinos estavam em vários estádios de desenvolvimento, desde grãos de pólen jovens (com um núcleo), até já completamente formados (com três núcleos e amido) e, dessa forma, foram agrupados para a análise. O número de plantas avaliadas variou por genótipo, tanto na avaliação de pólen jovem quanto de pólen maduro. Os genótipos avaliados, bem como o número de plantas avaliadas por genótipo, para as análises de pólen jovem e maduro estão dispostos na Tabela 5.

TABELA 5. Genótipos avaliados quanto a viabilidade de pólen jovem e maduro e número de plantas avaliadas por genótipo. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Avaliação	Genótipo	Número de plantas
Pólen Jovem	Sabuguinho ou Mato Grosso	12
	Brasino	17
	POP – 5 (estaca 21)	14
	Colonial Vermelho	8
	Argentino Flint	9
	Cunha	12
	Caiano Amarelo	12
Pólen Maduro	Sabuguinho ou Mato Grosso	3
	POP – 5 (estaca 21)	6
	Colonial Vermelho	3
	Argentino Flint	2
	Cunha	5

A viabilidade dos grãos de pólen foi estimada de acordo com a capacidade de coloração do citoplasma dos mesmos com o corante. Na análise de grãos de pólen jovens, foram considerados viáveis os que apresentaram tamanho e forma normais e a presença de um único poro. Na análise de grãos de pólen maduros, os viáveis foram aqueles que apresentaram coloração avermelhada, tamanho e forma normais e a presença de um poro. O percentual de grãos de pólen viáveis foi estimado através da divisão do número de pelos observados por lâmina, multiplicados por 100.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análises Fenotípicas

Os genótipos avaliados neste experimento apresentaram grande variabilidade em relação ao tipo e cor do grão (Figura 1), o que sugere diferentes origens nestes genótipos.

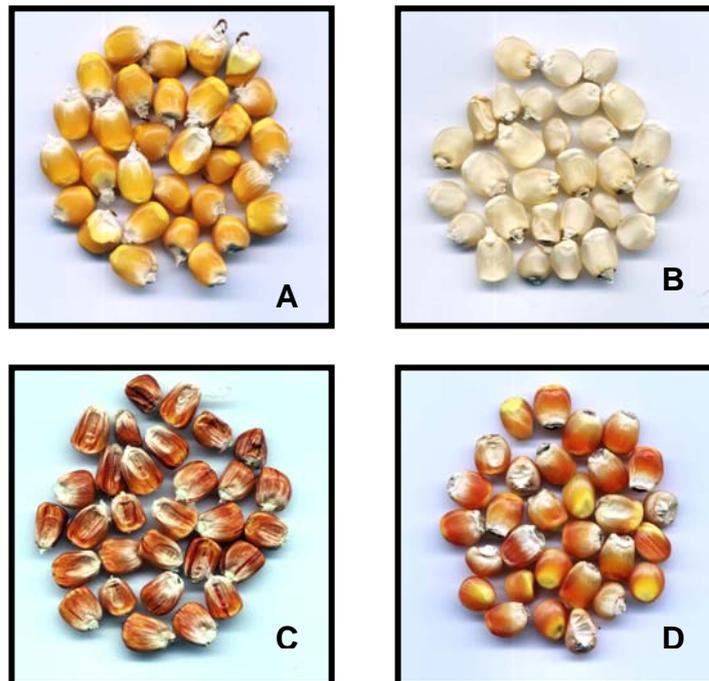


FIGURA 1. Variabilidade observada através da cor do grão. A: Caiano Amarelo; B: Cinquentinha; C: Caiano Rajado; D: Amarelão. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Os caracteres fenotípicos avaliados no experimento em Eldorado do Sul/RS também demonstraram a existência de variabilidade (Tabela 6). Através da análise de variância, foram observadas diferenças significativas a 5 % entre os genótipos em 9 dos 13 caracteres avaliados. Segundo revisão de Melo et al. (2001), a significância do efeito de cultivares, quando considerados diversos caracteres agronômicos, indica, em princípio, divergência genética entre eles.

TABELA 6. Resumo da análise de variância dos 13 caracteres avaliados nos 41 genótipos de milho crioulo, avaliados em Eldorado do Sul, 2003/2004. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Causas de Variação	GL	QM			
		FM	FF	Est.	IE
Genótipo	40	11.456,5*	10.598,4*	0,19*	0,10*
Repetição	2	23.847,8*	5.550,2	0,04	0,008
CV (%)	-	5,9	7,7	6,9	10,3

Causas de Variação	GL	QM			
		ED	CE	DE	F
Genótipo	40	186,1	10,7*	0,48	22,6*
Repetição	2	727,4*	3,2	0,49	2,4
CV (%)	-	82,2	9,8	13,9	8,6

Causas de Variação	GL	QM				
		Acam.	Quebr.	RE	RG	PG
Genótipo	40	24,1*	29,0	25.816.985*	16.426.703,1*	0,006*
Repetição	2	17,8	28,5	55.698.385*	28.582.363,2*	0,002
CV (%)	-	306,6	194,2	42,7	49,0	17,4

* Significância de 5 %; QM: quadrado médio; FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; Est.: estatura; IE: altura de inserção da espiga; ED: espigas doentes; CE: comprimento da espiga; DE: diâmetro da espiga; F: número de fileiras; Acam.: % de plantas acamadas; Quebr.: % de plantas quebradas; RE: rendimento de espigas; RG: rendimento de grãos; PG: peso de grão.

O coeficiente de variação (CV %) (Tabela 6) foi considerado reduzido para quase todos os caracteres avaliados, sendo considerado alto para percentual de espigas doentes (82,2 %), percentual de plantas acamadas

(306,6 %), percentual de plantas quebradas (194,2 %), rendimento de espigas (42,7 %) e rendimento de grãos (49 %). Altos valores de CV % são comumente encontrados nas três primeiras características porque são dados de contagem, os quais nem sempre seguem distribuição normal, o que contribui para elevar os erros experimentais em uma avaliação. Em relação aos caracteres rendimento de espigas e de grãos, os altos valores do CV % foram devido, provavelmente, a diferenças no estande final, provocadas por problemas de germinação das sementes de alguns genótipos.

O coeficiente de variação é utilizado para indicar o nível de precisão com que os caracteres são estimados. Scapim et al. (1995), desenvolveram uma classificação dos coeficientes de variação para o milho, baseados em 66 teses na área de genética e melhoramento vegetal. Segundo sua classificação, o CV % encontrado para o caráter estatura de planta e altura de inserção de espiga seriam considerados como médios (entre 4,5 – 9,0 e 6,5 – 13,0, respectivamente). Já para rendimento de espigas e de grãos, o CV % encontrado neste trabalho seria considerado como muito alto (maior que 28,0). O trabalho não apresentou classificação para os CV % dos demais caracteres avaliados. Gama et al. (1999), ao avaliarem o potencial genético em sintéticos de milho, encontraram CV % entre 9,37 e 14,46 para o caráter rendimento de espigas. Netto et al. (2002) encontraram CV % entre 6 e 25 para diversos caracteres.

A média do caráter florescimento masculino (Tabela 7) foi de 953,2 graus dias (GD) para as populações crioulas e 920,2 GD nas testemunhas. Para o caráter florescimento feminino a média das populações crioulas e das testemunhas foi de 1.026 GD e 979,7 GD, respectivamente. A média geral para

o florescimento masculino foi de aproximadamente 85 dias e para o florescimento masculino aproximadamente 90 dias. Para ambos caracteres foi observado um desvio padrão relativamente alto (78,84 e 87,31, respectivamente), indicando variabilidade entre as populações analisadas.

TABELA 7. Análises descritivas dos caracteres agrônômicos avaliados nos 41 genótipos de milho crioulo em Eldorado do Sul 2003/2004. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Descritores	FM (GD)	FF (GD)	Est. (m)	IE (m)
Média geral	949,98	1021,50	2,11	1,28
Média milho crioulo	953,20	1.026,00	2,20	1,30
Média testemunhas	920,20	979,70	1,90	1,10
Desvio padrão (DP)	78,94	87,31	0,28	0,21
Nº genótipos crioulos + 1 DP	0	1	4	2
Nº genótipos crioulos - 1 DP	5	2	7	4

Descritores	ED (%)	CE (cm)	DE (cm)	F
Média geral	14,37	17,54	4,47	13,30
Média milho crioulo	14,50	17,40	4,40	13,10
Média testemunhas	10,10	19,10	4,70	15,20
Desvio padrão (DP)	12,83	2,34	0,65	2,88
Nº genótipos crioulos + 1 DP	0	2	0	4
Nº genótipos crioulos - 1 DP	13	5	3	2

Descritores	Acam. (%)	Quebr. (%)	RE (Kg/ha)	RG (Kg/ha)	PG (g)
Média geral	1,25	2,28	6.715,04	5.226,60	0,30
Média milho crioulo	1,10	2,50	6.305,10	3.882,30	0,30
Média testemunhas	0,60	2,40	10.506,90	7.213,50	0,30
Desvio padrão (DP)	4,21	4,78	3.843,60	3.187,84	0,06
Nº genótipos crioulos + 1 DP	0	0	3	3	3
Nº genótipos crioulos - 1 DP	0	0	5	1	5

FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; Est.: estatura; IE: altura de inserção da espiga; ED: % de espigas doentes; CE: comprimento da espiga; DE: diâmetro da espiga; F: número de fileiras; Acam.: % de plantas acamadas; Quebr.: % de plantas quebradas; RE: rendimento de espigas; RG: rendimento de grãos; PG: peso de grão.

Quanto à estatura de planta, observou-se uma média geral alta, de 2,11 m. Esta média se deve aos altos valores encontrados nas populações crioulas, que apresentaram média de 2,2 m. Entretanto, sete genótipos crioulos

apresentaram média – 1 desvio padrão (DP), o que indica que podem ser genótipos importantes na seleção do caráter baixa estatura. O mesmo foi encontrado no caráter altura de inserção de espiga, com média geral de 1,28 m e quatro genótipos possíveis de serem selecionados para o caráter.

Em relação ao percentual de espigas doentes, a média foi de 14,37 %. Já nos caracteres % de plantas acamadas e quebradas, a média foi extremamente baixa, de 1,25 e 2,28 % respectivamente, não variando muito entre as populações crioulas e as testemunhas. Também não foi observado nenhum genótipo que tenha se destacado para estas características.

O caráter comprimento da espiga apresentou média de 17,5 cm havendo possibilidade de seleção de dois genótipos para este caráter. Resultados similares foram encontrados para o caráter diâmetro da espiga, que apresentou média de 4,4 cm, variando pouco entre as populações crioulas e as testemunhas. Nenhum genótipo se destacou para este caráter. Em relação ao número de fileiras por espiga, observou-se média geral de 13,3. Quatro genótipos apresentaram média + 1 DP, destacando-se para serem utilizados como fonte de germoplasma para a melhoria deste caráter.

A média geral encontrada para o caráter rendimento de espigas foi de 6.715 kg/ha, observando-se uma diferença de mais de 4.000 kg/ha entre as populações crioulas (6.305 Kg/ha) e as testemunhas (10.507 Kg/ha). Os altos valores do desvio padrão (3.843,6) indicam a existência de grandes diferenças entre o rendimento nas populações avaliadas. A média geral do rendimento de grãos (4.182,7 Kg/ha) superou a média do estado do Rio Grande do Sul em 2003, que foi de 3.833 Kg/ha (IBGE). No entanto, observou-se uma grande diferença entre a média do rendimento de grãos das populações crioulas

(3.882,3 Kg/ha) e as testemunhas (7.213,5) e também grande variação entre os genótipos em geral, com desvio padrão de 3.187,8, destacando-se três populações com média + 1 DP.

O caráter peso de grão apresentou média geral de 0,30 g, sem diferenças entre as populações de milho crioulo e as testemunhas. Não foram observadas grandes variações entre os genótipos, porém três genótipos destacaram-se com média + 1 DP.

Estes resultados não só demonstram a presença de variabilidade entre os genótipos, mas também indicam que existem, entre eles, genótipos que podem ser utilizados em programas de melhoramento genético com o intuito de melhorar o caráter pelo qual se destacaram.

Netto et al. (2002) avaliaram 21 caracteres morfológicos em 58 genótipos de milho do tipo duro, provenientes da coleção nuclear da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas/MG). Verificaram que as maiores variações foram em peso de grãos, peso de espiga, ramificação do pendão, altura de inserção de espiga e peso de mil sementes. As menores variações foram encontradas em número de folhas acima da espiga superior, diâmetro do colmo, estatura de planta, comprimento da folha e diâmetro da espiga. Observaram que as contribuições mais importantes dos descritores na variabilidade genética dos genótipos foram peso de mil sementes, altura de inserção de espiga, estatura de planta, peso de espiga e peso de grãos.

Foi observado que os genótipos de milho crioulo apresentaram comportamento diferenciado em relação às testemunhas, para diversos caracteres avaliados. Guadagnin et al. (2002), em ensaio de avaliação de variedades melhoradas, milhos crioulos e híbridos encontraram médias para

estatura de planta de 2,32 metros (m) nos híbridos e 2,6 m nos milhos crioulos. No caráter altura de inserção de espiga, a média foi de 1,4 m nos híbridos e 1,8 m nos milhos crioulos e no caráter rendimento de espigas, a média foi de 8.372,2 kg/ha nos híbridos e 4.580 kg/ha nos crioulos.

Em outro ensaio de variedades melhoradas, milhos crioulos e híbridos caseiros (desenvolvidos pelos agricultores), tendo híbridos comerciais como testemunhas, encontrou-se uma produtividade média de 2.000 Kg/ha nas variedades melhoradas, 1.854 Kg/ha nos milhos crioulos, 3.315 Kg/ha nos híbridos caseiros e 4.462 Kg/ha nos híbridos comerciais (Guadagnin & Buzzetti, 2002). Com estes resultados, observa-se que as variedades crioulas alcançam, em média, 50 % da produção dos híbridos.

Com o intuito de verificar quais genótipos eram os mais variáveis entre as características que apresentaram significância na análise de variância, foi realizado um Teste de Tukey (SAS). Os genótipos mais contrastantes podem ser observados na Tabela 8.

O genótipo Sabuguinho amarelo foi o mais tardio no florescimento feminino, mais alto, com a mais alta inserção de espiga, com menor rendimento de espigas e de grãos, demonstrando ser um genótipo de pouco interesse para o melhoramento. As testemunhas (Pampa, TORK e NB 3311) apresentaram os melhores resultados nos caracteres avaliados, com exceção do caráter florescimento masculino, onde o mais precoce foi o genótipo 8 Carreiras Branco e do caráter número de fileiras, onde o genótipo Dente de Cão foi o destaque.

TABELA 8. Agrupamentos formados pelo Teste de Tukey. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Característica	Nº de grupos	Grupos e Genótipos mais contrastantes
Florescimento masculino	2	A: Comum Amarelo B: 8 carreiras Branco
Florescimento feminino	2	A: Sabuguinho Amarelo B: NB 3311
Estatuta	11	A: Sabuguinho Amarelo L: TORK
Inserção de espiga	7	A: Sabuguinho Amarelo G: NB 3311
Acamamento	2	A: Cunha B: TORK
Tamanho de espiga	6	A: Pampa F: Cunha
Número de fileiras	7	A: Dente de Cão C: 8 carreiras Amarelo
Rendimento de espigas	3	A: TORK C: Sabuguinho Amarelo
Rendimento de grãos	3	A: TORK C: Sabuguinho Amarelo

Contudo, a indicação de genótipos crioulos que se destaquem para os caracteres de interesse é uma informação de extrema importância para os programas de melhoramento. Por esta razão, foi realizada uma análise em cada um dos caracteres que apresentaram diferenças significativas as quais foram submetidas ao Teste Tukey. Nesta análise foram observados os genótipos que apresentaram as médias mais próximas àqueles que foram os melhores citados na Tabela 8. Os resultados obtidos nesta análise estão descritos abaixo.

Os genótipos 8 Carreiras Branco e Cinquentinha demonstraram potencial para precocidade tanto no florescimento feminino quanto no masculino. O genótipo Assis Brasil (estaca 31) apresentou resultados similares às testemunhas (TORK e NB 3311) que se destacaram nos caracteres estatuta e altura de inserção de espiga. Em relação ao tamanho das espigas, o genótipo

Colonial (Santa Eulália - 2) foi o mais próximo à testemunha Pampa, também podendo ser utilizado como fonte de variabilidade para este caráter nos programas de melhoramento. O genótipo Assis Brasil (estaca 31) também apresentou uma média satisfatória de número de fileiras por espiga (17,4), sendo uma opção viável para seleção deste caráter. Quanto ao rendimento de espigas e grãos, os genótipos Assis Brasil (estaca 16), Cabo Roxo e Argentino Flint apresentaram as médias mais próximas à testemunha TORK, que se destacou para este caráter.

Os resultados obtidos no teste Tukey permitiram indicar, em relação a todos os caracteres avaliados, o genótipo Cinquentinha como o destaque entre as populações crioulas analisadas.

Em relação ao experimento realizado em Pelotas, onde se buscou verificar o efeito ambiental sobre os genótipos, não foi evidenciada interação genótipo X ambiente em nenhum dos caracteres analisados (Tabela 9), indicando pouca influência do ambiente nos genótipos. Caracteres qualitativos como estatura de planta e altura de inserção de espiga normalmente sofrem pouca influência ambiental. Entretanto, acamamento, quebramento e rendimento de grãos são caracteres quantitativos os quais normalmente apresentam interação genótipo X ambiente. Uma possível explicação é que nestes genótipos não exista interação genótipo X local. Federizi et al. (1993) avaliaram 20 genótipos de aveia em quatro locais diferentes durante três anos. Os resultados indicaram que a interação genótipo X local não era importante para a cultura, porém foi constatada a existência de uma forte interação genótipo X ano, o que possivelmente pode ocorrer com o milho.

Entretanto, Melo et al. (2001) avaliaram caracteres de colmo, da folha, do pendão, da espiga, do grão e da planta em 10 híbridos de milho em Lavras e Ijaci, ambos em Minas Gerais. Através de uma análise multivariada, observaram significância de 1 % para efeito de cultivar, local e interação cultivar X local, inferindo que pelo menos um cultivar, dos dez avaliados, apresentava divergência em relação aos demais.

TABELA 9. Análise de variância conjunta entre os dados coletados em Eldorado do Sul (RS) e Pelotas (RS), 2003/2004. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Causas de Variação	GL	QM				
		Est.	IE	Acam.	Quebr.	RG
Genótipo (G)	40	0,32**	0,16**	20,48**	34,28	14.454.928,7**
Local (L)	1	0,15	0,24	7,32	59,96	327.503.672,8
G X L	31	0,03	0,02	7,82	12,92	3.930.749,0

** : significância de 1 %; QM: quadrado médio; Est.: estatura; IE: altura de inserção da espiga; Acam.: acamamento; Quebr.: quebramento; RG: rendimento de grãos.

4.1.1 - Estimativa da variabilidade genética

Em função dos caracteres avaliados, o germoplasma foi agrupado de acordo com a sua divergência genética. Segundo revisão de Garbuglio & Araújo (2004), a avaliação da divergência genética através de técnicas multivariadas, realizadas *a priori* nas populações estudadas evitaria a realização de muitos cruzamentos, o que reduziria o custo e melhoraria a precisão das avaliações. De acordo com revisão de Netto et al. (2002), o agrupamento pode ser realizado através de técnicas de análise multivariada como a análise de componentes principais, análise de agrupamento, distância de similaridade entre outras.

A possibilidade de classificar os genótipos em grupos vem sendo empregada pelos melhoristas há vários anos, pois esta facilita a escolha de

parentais para hibridações, além de ser útil em casos de busca de genótipos divergentes para a construção de híbridos, o que maximiza a heterose (Melo et al., 2001).

A distância genética entre as populações de milho foi estimada pela Distância Euclidiana. A matriz de distância genética foi utilizada para gerar o dendograma (Figura 2) através do procedimento SAHN do aplicativo NTSYS (Rohlf, 2000).

A maior distância observada foi de 5,30 entre os genótipos Assis Brasil (estaca 31) (genótipo 19) e Colonial (Santa Eulália - 1) (genótipo 22) e a menor foi de 0,01 entre os genótipos 8 Carreiras Branco (genótipo 1) e Cinquentinha (genótipo 3). No dendograma foram formados dois grandes grupos independentes sendo que as populações testemunhas (BR – 451 e Pampa, genótipos 14 e 32, respectivamente) ficaram em um grupo e as testemunhas híbridas (NB 3311 e TORK, genótipos 40 e 41, respectivamente) em outro, indicando origens genéticas diferentes.

Não foi observado agrupamento por local de coleta, entretanto sugere-se uma origem genética comum entre os genótipos que constituíram cada grupo. Observou-se que o genótipo Sabuguinho amarelo (genótipo 39), o qual apresentou diversos caracteres morfológicos indesejáveis na análise de variância e teste de Tukey foi o genótipo mais distante do primeiro grupo formado, confirmando o seu distanciamento em relação aos demais genótipos. Não foi observado nenhum genótipo isolado dos demais, o que indica que todos os genótipos avaliados estão relacionados geneticamente entre si, em maior ou menor grau.

O maior grupo formado (do genótipo 1 ao 39) foi constituído, no geral, por genótipos tardios, com estatura de planta mediana (entre 2 – 2,5 m), alto rendimento e maior percentual de plantas acamadas. Já os genótipos que constituíram o segundo grande grupo (do genótipo 10 ao 34) apresentaram-se, de modo geral, mais precoces, com estatura de planta baixa, com espigas maiores, entretanto, rendimento mais baixo. É interessante notar que os híbridos comerciais utilizados como testemunhas (genótipos 40 e 41), os quais apresentaram os rendimentos mais altos ficaram no grupo com rendimento mais baixo. Isto deve ter ocorrido, provavelmente, por uma possível origem desses híbridos em algum dos genótipos crioulos dispostos no mesmo grupo.

O ponto de corte foi estimado em 2,64, através da média das distâncias entre todos os genótipos. A partir deste ponto observam-se quatro grupos, sendo um deles independente dos demais, constituído de 26 genótipos, o que reforça o indício de similaridade entre eles. Os demais grupos foram constituídos por um menor número de populações.

O coeficiente da correlação cofenética, o qual indica o quanto o agrupamento dos genótipos representado no dendograma representa a estimativa da similaridade genética a partir de determinado marcador (Pejic et al., 1998) foi 0,99.

Andrade et al. (2002), objetivando caracterizar e avaliar a variabilidade genética por meio de marcadores fenotípicos em variedades que constituem o Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG), utilizaram a Distância Euclidiana para determinar os agrupamentos. As características avaliadas foram florescimento masculino e feminino, estatura de planta, altura de inserção de espiga, acamamento e quebramento, prolificidade,

peso de espiga e peso de grão. Constataram a existência de grande variabilidade fenotípica para todas as características estudadas e os agrupamentos foram feitos em função do tipo de endosperma (doce, amiláceo, pipoca, dentado, semidentado, duro e semiduro).

Teixeira et al. (2002) avaliaram 168 genótipos de milho, originários da região Nordeste do Brasil e um genótipo do Chile (Camélia). O objetivo do trabalho era avaliar o germoplasma quanto a diversos caracteres morfológicos e estimar a divergência genética entre os acessos. Observaram que todos os genótipos apresentaram diferenças significativas entre médias para todas as características consideradas, o que indicou grande variabilidade genética. Os agrupamentos foram construídos para cada tipo de grão (duro, semidentado, dentado, farináceo) e os autores constataram que as diferenças morfológicas encontradas entre os acessos forneceram dados suficientes para calcular a distância entre os genótipos e agrupá-los.

No trabalho realizado por Netto et al. (2002), o grau de diversidade genética através de caracterização morfológica entre genótipos de milho do tipo duro, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG), indicaram que as análises descritivas dos caracteres morfológicos avaliados mostraram a variabilidade genética presente nos genótipos. Para determinar se os genótipos poderiam ser considerados grupos dissociados, foi realizada uma análise de agrupamento e, para examinar a sua relação espacial, fizeram uma análise de componentes principais. Ambas análises confirmaram que os acessos apresentam-se distintos entre si.

Melo et al. (2001) estimaram a divergência genética entre híbridos comerciais de milho, através de caracteres morfoagronômicos, utilizando a Distância de Mahalanobis e separam os genótipos em quatro grupos.

Estes resultados evidenciam que a análise de caracteres morfológicos entre genótipos diferentes é uma forma eficiente de caracterizar a variabilidade genética, possibilitando o agrupamento dos mesmos em função das suas distâncias genéticas, gerando informações fundamentais para os programas de melhoramento.

4.2 – Análises Moleculares

4.2.1 - Padrão dos SSR

Foram detectados 60 alelos nos 23 locos analisados, com uma média de 2,3 alelos por loco. Dois pares de primers apresentaram-se monomórficos e o restante polimórficos, variando de dois a seis alelos por loco (Tabela 10). Os tamanhos alélicos variaram de 60 a 300 pares de bases (pb). Almeida (2003), em genótipos de milho, avaliou 10 locos SSR e encontrou uma média de 3,3 alelos por loco. Valores similares foram encontrados por Terra (2004) que, ao avaliar 13 locos SSR em populações de milho comum, milho doce e teosinto, encontrou uma média de 4,4 alelos por loco. Já Reif et al. (2003) avaliaram 85 pares de primers SSR em populações tropicais de milho e encontraram uma média de 6,3 alelos por loco.

TABELA 10. Primers de SSR, locos, número de alelos por loco, tamanhos dos alelos e PIC. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Número	Primer	Nº de alelos	Tamanho (pb)	PIC
1	umc 1547	2	60 – 84	0,47
2	umc 1026	2	130 – 150	0,52
3	umc 1696	2	110 – 160	*
4	umc 1683	4	90 – 130	0,21
5	phi 073	1	93	0,18
6	umc 1594	2	130 – 150	0,18
7	umc 1294	2	270 – 300	0,17
8	nc 004	4	150 – 200	0,19
9	phi 074	3	90 – 210	0,27
10	umc 1173	3	150 – 170	0,47
11	umc 1197	2	80 – 105	0,28
12	umc 1097	2	100 – 130	0,37
13	umc 1056	6	110 – 160	0,16
14	umc 1341	3	105 – 140	0,67
15	umc 1545	3	50 – 90	0,38
16	umc 1433	2	50 – 90	0,43
17	umc 1627	2	150 – 170	0,20
18	umc 1172	2	150 – 170	0,29
19	umc 1636	3	100 – 150	0,32
20	phi 065	3	140 – 160	0,18
21	phi 016	4	140 – 180	0,58
22	phi 032	2	190 – 250	0,29
23	umc 1648	1	140	*
Média do PIC				0,32

* Primer monomórfico

Os valores de PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) (Tabela 10), que fornecem uma estimativa do poder discriminatório do marcador, apresentaram um valor médio de 0,32, variando entre 0,17 e 0,67, nos primers umc1294 e umc1341, respectivamente. O PIC é o grau de polimorfismo detectado a partir de um determinado par de primer, que está diretamente relacionando com a variabilidade da região nos genótipos avaliados. Laborda et al. (2004) analisaram 50 locos SSR em populações tropicais de milho e encontraram valores de PIC similares, variando entre 0,2 a 0,9. Porém, Matsuoka et al. (2002) encontraram valores médios de 0,62. Uma possível

explicação para este alto valor médio de PIC é que os autores avaliaram 161 populações, o que pode indicar que valores de PIC podem ser aumentados de acordo com o número de genótipos avaliados.

4.2.2 - Padrão dos AFLP

Foram avaliadas três combinações de primers AFLP. As combinações analisadas foram P1 + M1, P1 + M2 e P1 + M3 (Tabela 4). Foram obtidas 136 bandas polimórficas, com uma média de 45 bandas por combinação, com dois alelos por loco (presença e ausência). Os locos variaram entre 250 e 1600 pb (Tabela 11).

Os marcadores AFLP são do tipo dominantes. São extremamente eficientes, pois geram um número expressivo de bandas por combinação de primer. Entretanto, apresentam pouco polimorfismo, ao contrário dos marcadores SSR. Pejic et al. (1998) encontraram, em média, 6,8 alelos por loco avaliando 27 pares de primers SSR em linhas de milho. Já em relação aos AFLP, encontraram, em média, 39 locos por combinação de primers, com dois alelos por loco.

TABELA 11. Número de locos encontrados por combinação de primers e tamanho das bandas. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Combinação	Nº de locos	Nº de alelos/loco	Peso Molecular
P1 + M1	27	2,0	250 – 1600
P1 + M2	72	2,0	393 – 1475
P1 + M3	37	2,0	271 – 1057
Média	45	2,0	-

Neste trabalho, não foram encontradas grandes diferenças no número médio de alelos entre os marcadores SSR (2,3) e AFLP (2,0). Como foram avaliados bulks de 20 plantas por genótipo, o esperado seria uma média de alelos por loco SSR mais alta. Contudo, estes resultados foram obtidos, provavelmente, pelos primers escolhidos apresentarem pouca variação nas populações estudadas.

4.2.3 - Divergência genética estimada pelos marcadores SSR e AFLP

A distância genética foi obtida pelo coeficiente de NEI72, que expressa as diferenças nas frequências alélicas ocorridas durante o tempo de diferenciação das populações. Os dados obtidos através das análises dos marcadores SSR e AFLP foram agrupados para a verificação das distâncias genéticas. A maior distância observada (4,03) foi entre os genótipos Sabuguinho Amarelo (genótipo 39) e Colonial Vermelho (genótipo 24) e a menor (0,26) entre os genótipos Ferro (genótipo 5) e Amarelão (genótipo 6).

Quando avaliados separadamente, os marcadores SSR e AFLP formaram agrupamentos diferentes, porém ambos foram capazes de inferir a distância genética existente entre os genótipos de milho analisados. A diferença principal entre eles é que os SSR são marcadores co-dominantes, ou seja, privilegiam as diferenças entre os genótipos pois informam a respeito dos alelos presentes na população avaliada. Já os AFLP, por serem dominantes, dão privilégio as semelhanças, pois não são capazes de separar os dominantes dos heterozigotos. Dessa forma, pode-se sugerir o uso dos SSR quando se busca identificar diferenças e o uso dos AFLP quando se busca

identificar semelhanças. Laborda et al. (2004) avaliaram a diversidade genética existente entre 85 linhagens de milho tropical através dos marcadores AFLP e SSR. Observaram que os AFLP agruparam as linhagens de acordo com as suas origens históricas conhecidas e os SSR formaram grupos não consistentes com o esperado. Os resultados indicaram que os SSR não foram eficientes para agrupar as linhagens, mas mostraram-se úteis na diferenciação das mesmas. Já os AFLP não exibiram a real diversidade genética presente entre os genótipos, mas foram bem sucedidos na tarefa de agrupá-los.

O coeficiente da correlação cofenética observado na análise dos marcadores SSR e AFLP em conjunto foi de $r = 0,91$.

O dendograma construído a partir dos dois marcadores (Figura 3) formou oito grandes grupos, sendo que o genótipo Sabuguinho Amarelo (genótipo 39) foi o mais distante entre os demais, inclusive que o teosinto (genótipo 42), a possível espécie ancestral. Este resultado, provavelmente, é consequência da escolha das combinações de primers AFLP, os quais apresentaram um grande número de locos específicos para o genótipo.

Entretanto, adotando o ponto de corte a partir da média das distâncias (0,75), além do genótipo Sabuguinho Amarelo, o teosinto também ficou individualizado, e neste caso, formaram-se ainda três grupos, sendo que um deles constituído somente pelas testemunhas híbridas, confirmando uma possível origem comum já observada nos dados morfológicos. Outro grupo foi formado pelos genótipos Cunha Sabugo Duplo (genótipo 36), Cunha Sabugo Fino (genótipo 37) e Caiano Amarelo (genótipo 38), dos quais os dois primeiros também foram agrupados a partir dos dados morfológicos, confirmando também uma origem comum.

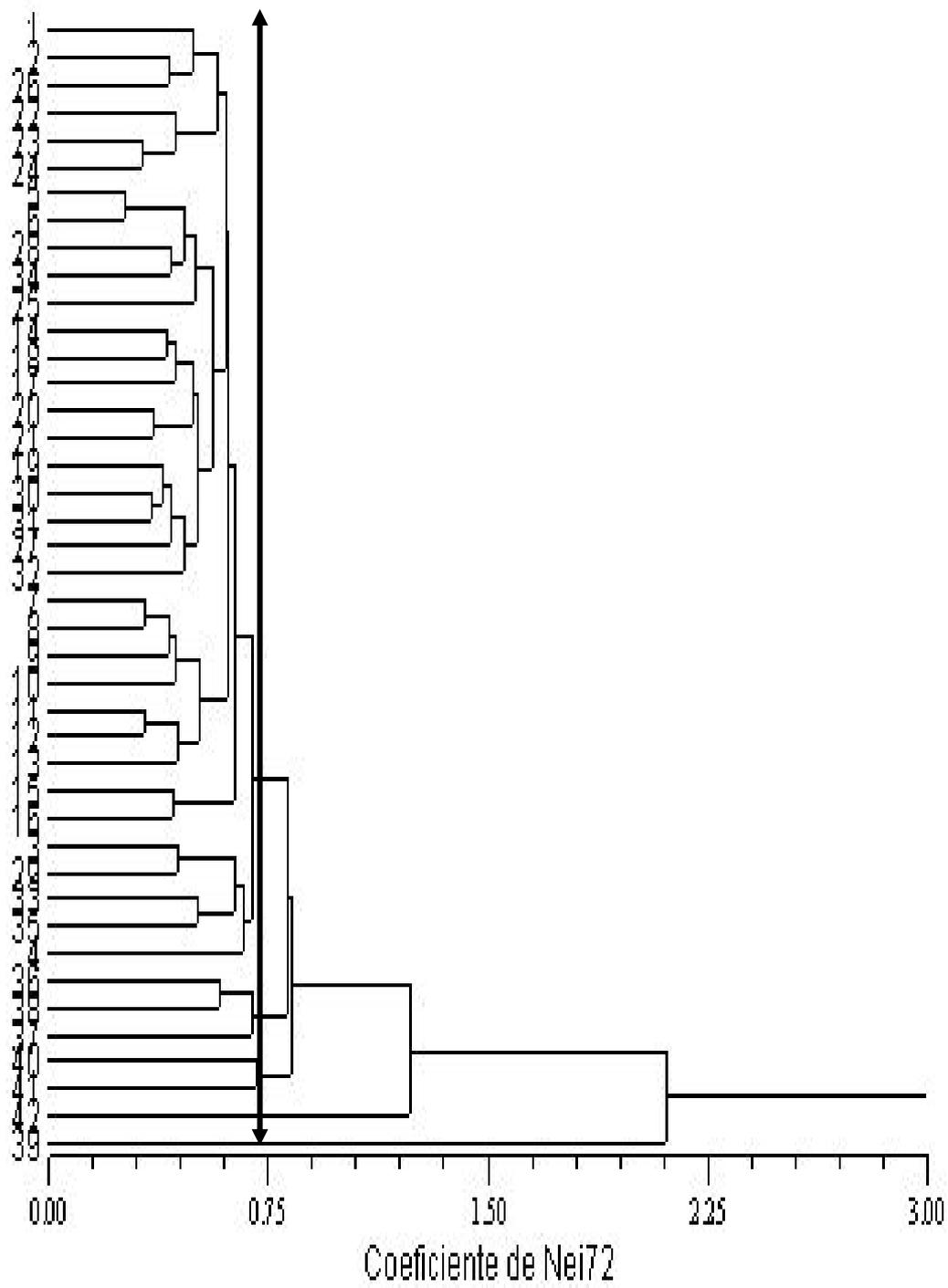


FIGURA 3. Agrupamento obtido pela matriz de distância genética, baseado no Coeficiente de Nei72 (SAHN - NTSYS). Os números correspondem aos genótipos citados na Tabela 1. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

As distâncias genéticas observadas não foram consideradas de alta magnitude. Por esta razão foi verificada a possibilidade de populações com nomes diferentes possuírem o mesmo genótipo. A melhor forma de fazer esta investigação seria através da análise da variabilidade genética intra-populacional, a partir da qual seria possível estimar um valor de distância genética para se considerar dentro do mesmo genótipo ou não. Porém, esta investigação não foi possível.

Contudo, mesmo sem esta análise intra-populacional, suspeita-se que os genótipos Colonial (Santa Eulália -1) (genótipo 22), Colonial (Santa Eulália -2) (genótipo 23) e Colonial vermelho (genótipo 24) possivelmente apresentem uma origem comum. Se as populações que foram agrupadas bem próximas realmente tenham uma origem comum, a distância genética observada entre elas foi, provavelmente, devido a presença de diferentes alelos, já que se trata de uma espécie alógama.

A matriz da Distância Euclidiana obtida a partir dos dados morfológicos e a matriz do Coeficiente de Nei72 obtida a partir dos dados moleculares dos marcadores SSR e AFLP apresentaram correlação extremamente baixa ($r = 0,03$), indicando que estão pouco correlacionadas, o que sugere a necessidade de ambas análises, ou seja, uma não substitui a outra. Amorin et al. (2003) estimou a diversidade genética entre genótipos de milho doce através de marcadores morfológicos e moleculares, utilizando RAPD e SSR. Observou que marcadores morfológicos e RAPD não são correlacionados ($r = - 0,06$) e que SSR e marcadores morfológicos são pouco correlacionados ($r = 0,10$).

Melo et al. (2001) avaliaram caracteres morfológicos e moleculares (RAPD) em híbridos de milho (como já citado anteriormente), e estimaram a

divergência genética entre os genótipos. Observaram que ambos marcadores foram eficientes na separação dos genótipos. Contudo, a correlação entre eles, embora significativa, foi de pequena magnitude ($r = 0,26$), indicando que são medidas distintas, porém complementares.

Alguns genótipos podem ser geneticamente próximos, mas possuidores de características agrônômicas divergentes e importantes. O dendograma é útil, pois permite identificar possíveis combinações parentais divergentes, que permitam explorar a heterose e a troca de material genético.

4.3 – Análises Citogenéticas

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos na análise da viabilidade de pólen jovem e maduro. As anomalias avaliadas nos pólenes jovens foram pólen vazio, menor, menor e sem poro, forma irregular e mais de um poro (Figura 4). No pólen maduro foram avaliados pólenes vazios, menores e com forma irregular (Figura 5).

TABELA 12. Viabilidade de pólen jovem e maduro em genótipos de milho crioulo. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Pólen Jovem			Pólen Maduro		
	Plantas analisadas	Células analisadas	Viabilidade de pólen (%)	Plantas analisadas	Células analisadas	Viabilidade de pólen (%)
11	12	4.800	99,9	3	1.200	93,8
12	17	6.800	99,9	**	**	**
18	14	5.600	99,6	6	2.400	95,6
24*	8	3.200	99,9	3	1.200	97,0
27	9	3.600	99,7	2	800	97,6
35	12	4.800	97,7	5	2.000	92,8
38	12	4.800	99,5	**	**	**
Média	-	-	99,4	-	-	95,4
Total	96	33.600	-	19	7.600	-

* Testemunha; ** Genótipos não avaliados para pólen maduro.

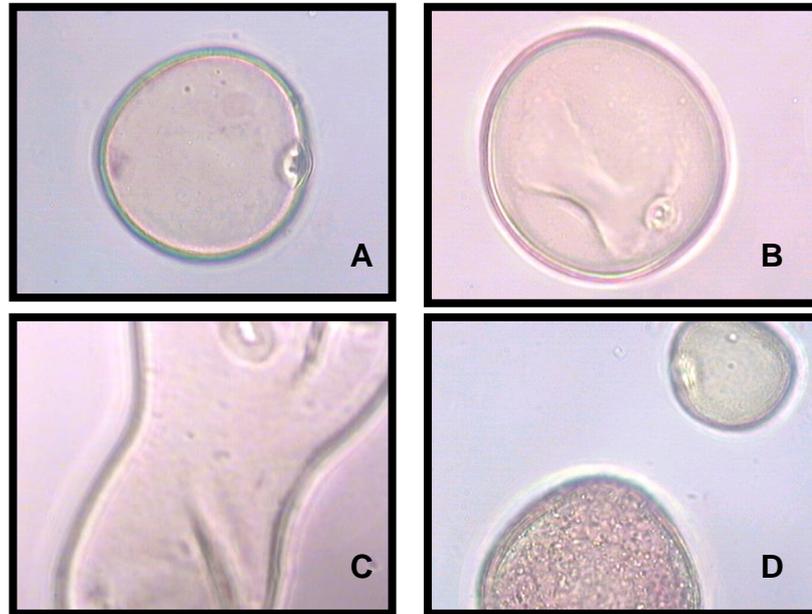


FIGURA 4. Grãos de pólen jovens de milho crioulo. A) Normal; B) Vazio; C) Forma anormal; D) Menor. Aumento 400 X. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

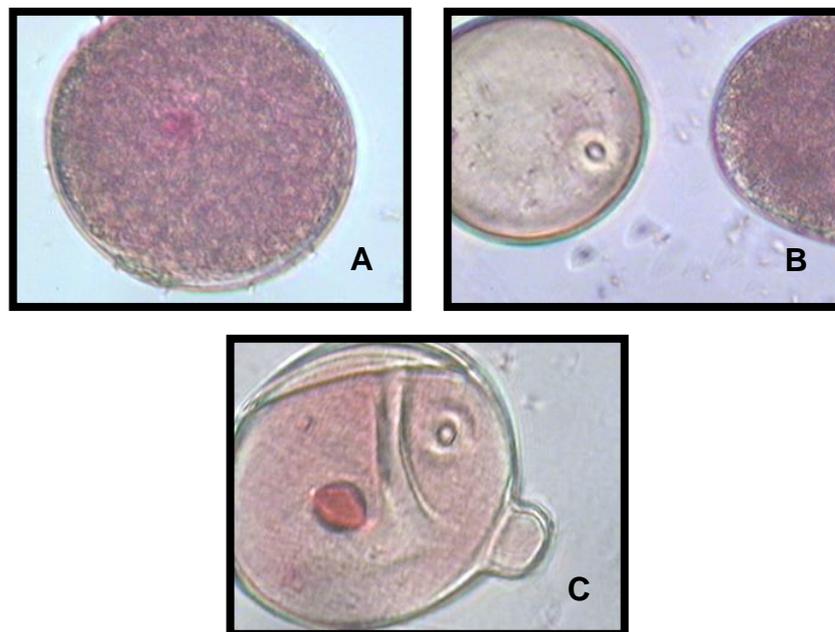


FIGURA 5. Grãos de pólen maduros de milho crioulo. A) Normal; B) Vazio; C) Forma irregular. Aumento: A e C: 400X; B) 100X. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Observou-se que todos os genótipos analisados tanto para pólen jovem quanto para pólen maduro apresentaram bom índice de viabilidade, variando entre 97,7 e 99,9 % nos pólenes jovens e entre 92,8 e 97,6 % nos pólenes maduros. Também foi observado que poucos pólenes desenvolveram anomalias durante a sua maturação, pois a média do percentual de pólenes jovens viáveis foi de 99,4 e de pólenes maduros 95,4, uma diferença de apenas 5 %. Estes resultados indicam que as populações de milho crioulo avaliadas não apresentam barreiras reprodutivas em relação a produção de pólen, o que indica que possuem meiose estável.

A microsporogênese envolve desde a meiose em células mãe de pólen até a formação de pólen maduro. Em todas estas fases podem ocorrer anomalias ocasionadas pelo genótipo e/ou pelo ambiente. As chamadas mutações *mei* são mutantes meióticos que induzem irregularidades neste processo. Efeitos ambientais como estresse por alta temperatura, como observado por Bodanese-Zanettini et al. (1979) em trigo e agrotóxicos (Sereno, 1981) podem induzir anomalias meióticas as quais podem resultar na inviabilidade dos grãos de pólen. Outro fator que pode levar a problemas meióticos é a hibridização artificial entre espécies diferentes.

Neste sentido, Almeida (2003) avaliou a viabilidade de pólen em genótipos de milho, teosinto e híbridos entre milho e teosinto e encontrou uma média 99,3 % de pólenes viáveis nos híbridos, 99,7 % nas populações de milho e 100 % no teosinto. Terra (2004) encontrou resultados similares nas mesmas populações, com uma média de 96,8 % de pólenes viáveis nos híbridos, 99,4 % nas populações de milho e 100 % no teosinto, inferindo a existência de regularidade na formação dos gametas masculinos dessas populações.

Poggio et al. (1997) avaliaram a instabilidade genética em linhas múltiplas dominantes de milho (MDZ), a qual é provocada por um transposon. Descobriram que o citoplasma do teosinto poderia ser um ativador deste transposon. Analisaram as MDZ e suas linhas aloplásmicas com o teosinto (MDE) e observaram que as MDZ apresentaram número extremamente baixo de anormalidades meióticas, enquanto que as MDE apresentaram alto número de univalentes, citomixia, fusão de núcleos, pseudomultivalente, asinapsia e um nucléolo persistente na metáfase.

Segundo revisão de Caetano-Pereira & Pagliarini (1997), a citomixia, a qual resulta em desvios do número cromossômico, pode ser um mecanismo adicional para originar plantas aneulóides e poliplóides. Em milho, espécie que apresenta normalmente estabilidade genética, a citomixia pode contribuir na redução da viabilidade das plantas afetadas, levando a outras anomalias tais como degeneração do meiócito ou desvios no número de cromossomos, estando associado com irregularidades como fusão celular e mixoploidia. Todas estas anormalidades podem resultar na esterilidade parcial pela supressão da meiose ou pela geração de produtos não balanceados da meiose.

Caetano-Pereira et al. (1995) analisaram a fragmentação espontânea em microsporócitos de linhagens, híbridos simples e duplos de milho, em solo ácido e corrigido. As fases da meiose que mais manifestaram irregularidades foram o paquíteno, diplóteno e diacinese durante a prófase I. Também foram observadas anormalidades durante a metáfase e anáfases I e II. Estas anormalidades ocorreram preferencialmente nas linhagens, o que confirma que a endogamia no milho realmente leva a problemas meióticos. Além disso, o

maior número de irregularidades foi observado entre as plantas cultivadas em solo ácido, indicando que estresses ambientais realmente podem levar a problemas meióticos no milho.

Flores & Valls (1987), avaliaram a viabilidade de grãos de pólen em espécies de *Sorghastrum* ocorrentes no Rio Grande do Sul. Seus resultados indicaram que os grãos de pólen são bem formados e apresentam alto índice de fertilidade. Cavalcante et al. (2000) avaliaram a viabilidade dos grãos de pólen uma população alógama de citrus ((*Citrus clementina* X (*C. paradisi* X *C. tangerina*)) e observaram que a maioria das plantas produziam pólenes viáveis e, portanto, poderiam ser usados como doadores de pólen em cruzamentos programados.

Os resultados indicam que as populações crioulas avaliadas apresentam grãos de pólen viáveis, indicando, provavelmente, que sua meiose é normal. Mesmo que as populações apresentem em torno de 5 % de anormalidades meióticas, este percentual não é suficiente para reduzir o potencial reprodutivo deste genótipos.

5. CONCLUSÕES

Os genótipos de milho avaliados apresentaram variabilidade genética em relação aos caracteres morfológicos analisados, sendo possível a seleção de genótipos com caracteres de interesse. Além disso, foi possível agrupar os genótipos de acordo com a distância genética existente entre eles, formando grupos representados por populações com caracteres em comum.

Os marcadores moleculares utilizados foram eficientes na detecção de variabilidade genética e também se mostraram capazes de separar os genótipos em função da distância genética existente entre eles.

Os genótipos de milho crioulo não apresentaram problemas na viabilidade dos grãos de pólen, indicando que possuem meiose normal.

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, p. 81-102, 1987.

AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; FLUMINHAN, A.; SANTOS-SEREJO, J.A.; GARDINGO, J.R.; BERTÃO, M.R.; DECICO, M.J.U.; MONDIN, M. Heterochromatin of maize chromosomes: structure and genetic effects. **Genetics and Molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1015-1019, 2000.

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

AMORIN, E.; ALMEIDA, C.C.S.; SERENO, M.J.C.M; BERED, F; NETO, J.F.B. Genetic variability in sweet corn using molecular markers. **Maydica**, Bergamo, v. 48, p. 177-181, 2003.

ANDRADE, R.V.; SANTOS, M.X.; FERREIRA, A.S.; OLIVEIRA, A.C. 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.

BEAVIS, W.D.; GRANT, D.; ALBERTSEN, M.; FINCHER, R. 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.

BENCHIMOL, L.L.; BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; JUNIOR, C.L.S.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Comparação entre marcadores RFLP, AFLP e SSR para estudos de divergência entre linhagens de milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2001, Goiânia. Disponível em: www.sbmp.org.br/cbmp2001/area5/05Resumo150.htm. Acesso em: 22/03/2003.

BENNETT, M.D. Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. **Biological Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 82, p. 411-423, 2004.

BODAK, H.; PEDRAZA, F.; CREGAN, P.B.; BAKOZIGER, P.S.; DWEIKAT, I. Development and utilization of SSRs to estimate the degree of genetic relationships in a collection of pearl millet germoplasm. **Crop Science**, Madison, n. 43, p. 2284-2290, 2003.

BODANESE-ZANETTINI, M.H.; MORAES-FERNANDES, M.I.B.; SALZANO, F.M. 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.

CAETANO-PEREIRA, C.M.; PAGLIARINI, M.S. Cytomixis in maize microsporocytes. **Cytologia**, Tokio, v. 62, p. 351-355, 1997.

CAETANO-PEREIRA, C.M.; TASCHETTO, O.M.; DEFANI-SCOARIZE, M.A.; PAGLIARINI, M.S. Spontaneous chromosome fragmentation in maize microsporocytes. **Cytologia**, Tokio, v. 60, p. 297-301, 1995.

CAMUSSI, A. Numerical taxonomy of italian populations of maize based on quantitative traits. **Maydica**, Bergamo, v. 24, n. 3, p. 161-174, 1979.

CARVALHO, V.P.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; FERREIRA, J.M.; MOREIRA, R.M.P. Assessment of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 2, n. 4, p. 553-564, 2002.

CAVALCANTE, H.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DORNELLES, A.L.C. Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin ((*Citrus clementina* X (*C. paradisi* X *C. tangerina*)). **Scientia Horticulture**, Dorbecht, v. 86, p. 103-114, 2000.

CHANG, M.T.; NEUFFER, M.G. Maize microsporogenesis. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 232-243, 1989.

DEFANI-SCOARIZE, M. A.; PAGLIARINI, M.S.; AGUIAR, C.G. Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). **The Nucleous**, Calcutta, v. 39, p. 10-18, 1996.

DEL DUCA, L.J.A.; MORAES-FERNANDES, M.I.B. Meiotic instability in some brazilian common wheat cultivars. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 8, n. 4, 1980.

DOEBLEY, J.; BACIGALUPO, A.; STEC, A. Inheritance of kernel weight in two maize – teosinte hybrid populations: implications for crop evolution. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 85, p. 191-195, 1994.

EVANS, M.M.S.; KERMICLE, J.L. *Teosinte crossing barrier 1*, a locus governing hybridization of teosinte with maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 259-265, 2001.

EYRE-WALKER, A.; GAUT, R.L.; HILTON, H.; FELDMAN, D.L.; GAUT, B.S. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 4441-4446, 1998.

FEDERIZI, L.C.; NETO, J.F.B.; CARVALHO, F.I.F.; VIAU, L.V.M.; SEVERO, J.L.; FLOSS, E.L.; ALVES, A.; ALMEIDA, J.; SILVA, A.C. Estabilidade do rendimento de grãos em aveia: efeito do uso de fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 465-472, 1993.

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

FLORES, A.I.P.; VALLS, J.F.M. Aspectos citológicos (número cromossômico, regularidade meiótica e viabilidade do grão de pólen) em espécies do gênero *Sorghastrum* Nash (GRAMINEAE; ANDROPOGONEAE) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 36, p. 3-13, 1987.

GALINAT, W.C. The origin of corn. In: SPRAGUE, G. F. (ed). **Corn and Corn Improvement**. Madison: American Sociedade Agronomic, 1977. 47p.

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

GAMA, E.E.G.; PACHECO, C.A.P.; PARENTONI, S.N.; MEIRELLES, W.F.; CORREA, L.A. Variabilidade genética nos sintéticos de milho sin 53 e sin 61 para fins de melhoramento. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 46, p. 615-624, 1999.

GARBUGLIO, D.D.; ARAÚJO, P.M. Divergência genética estimada por caracteres morfoagronômicos em 12 populações de milho (*Zea mays*, L.) do IAPAR. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25, 2004, Cuiabá. **Resumos...** Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo: Empaer, 2004. Trabalho disponível em CDROM.

GAUT, B.S.; MAUD, L.T.; PEEK, A.; SAWKINS, M.C. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 13, p. 7008-7015, 2000.

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

GOODMAN, M.M. A brief survey of the races of maize and current attempts to infer racial relationships. In: WALDEN, D. B. **Maize Breeding and Genetics**, New York, p. 143-158, 1978.

GOODMAN, M.M. The races of maize. II. Use of multivariate analysis of variance to measure morphological similarity. **Crop Science**, Madison, v. 8, n. 6, p. 693-698, 1968.

GOODMAN, M.M. Maize. In: SIMONS, N.W.; SMARTT, J. **Evolution of crop plants**. 2.ed. New York: Longman Scientific Technical, 1995. 531 p.

GUADAGNIN, J.P.; BUZZETTI, D. Ensaio de avaliação de variedades melhoradas da FEPAGRO e milhos crioulos em Aratiba – 2001/02. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 47, 2002, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: FEPAGRO, 2002. Trabalho disponível em CDROM.

GUADAGNIN, J.P.; SARTORI, E.M.B.; CARBONERA, M.A. Ensaio de avaliação de variedades melhoradas, milhos crioulos, híbridos simples, híbridos triplos, híbridos duplos e F2. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 47, 2002, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: FEPAGRO, 2002. Trabalho disponível em CDROM.

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

HARLAN, J.R. **Crops and man**. Madison: American Society of Agronomy, 1992. 284 p.

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

HORMAZA, J.I.; HERRERO, M. Pollen selection. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 663-672, 1992.

KIDWELL, M.G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, Dordrecht, v. 115, p. 49-63, 2002.

LABORDA, P.R.; OLIVEIRA, K.M.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Diversidade genética entre linhagens de milho tropical: comparação entre marcadores AFLP e Microsatélites. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25, 2004, Cuiabá. **Resumos...** Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo: Empaer, 2004. Disponível em CDROM.

LI, YOU-CHUM; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Indiana, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

LOVE, R.M. **Estudos citológicos preliminares de trigos Rio-Grandenses**. Porto Alegre: Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, 1949. 14p. (Circular, 74).

LUBBERSTEDT, T.C.; 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.; MACHADO, A.T.; SILVA, B.M.; WEID, VON DER, J.M. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. 185 p.

MANARA, N.T.F.; MANARA, W. Número cromossômico e comportamento meiótico de um cultivar de aveia (*Avena* sp.). **Revista Centro Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 4, n. 4, p. 303-308, 1974.

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

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; SANCHEZ, J.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 9, p. 6080-6084, 2002.

MELO, W.M.C.; PINHO, R.G.V.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, D.F. 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.

MOLINA, M.C.; POGGIO, L.; NARANJO, C. Cytogenetic analysis in *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea mays* ssp. *parviglumis* and *Zea mays* ssp. *mays* x *Zea mays* ssp. *mexicana*. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, v. 107, n. 66, 1992.

MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, Berkeley, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

MURRAY, M; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

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...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. Disponível em www.abms.org.br/resumo34.doc. Acesso em: 22/03/2003.

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

PADILHA, L.; GUIMARÃES, C.T.; VIEIRA, M.G.G.C.; SOUZA, I.R.P.; PARENTONI, S.N.; PACHECO, C.A.P.; SANTOS, M.X.; GAMA, E.E.G.; PAIVA, E. Microsatélites fluorescentes na diferenciação de linhagens de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24, 2002, Florianópolis. **Resumos...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. Disponível em: www.abms.org.br/resumo37.doc. Acesso em: 22/03/2003.

PATERNIANI, E. Diversidade genética e raças de milho no Brasil. In: SOARES, A.C.; MACHADO, A.T.; SILVA, B.M.; WEID, J.M. von der. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. 185p.

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

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

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

POGGIO, L.; ROSATO, M.; MAZOTI, L.B.; NARANJO, C.A. Variable meiotic behaviour among plants of an alloplasmic line of maize. **Cytologia**, Tokyo, v. 62, p. 271-274, 1997.

POGGIO, L.; CONFALONIERI, V.; COMAS, C.; GONZALEZ, G.; NARANJO, C.A. Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1021-1027, 2000.

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

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

REIF, J.C.; MELCHINGER, A.E.; XIA, X.C.; WARBURTON, M.L.; HOISINGTON, D.A.; VASAL, S.K.; ERINIVASAN, G.; BOHN, M.; FRISCH, M. Genetic distance on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1275-1282, 2003.

REIF, J.C.; XIA, X.C.; MELCHINGER, A.E.; WARBURTON, M.L.; HOISINGTON, D.A.; BECK, D.; BOHN, M.; FRISCH, M. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical and temperate germoplasm by SSR markers. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 326-334, 2004.

RODRIGUEZ-GARAY, B.; BARROW, J.R. Pollen selection for heat tolerance in cotton. **Crop Science**, Madison, v. 28, p. 857-859, 1988.

ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Software, 2000. 38p. (version 2.1).

RUNNING, M.; SCANLON, M.; SINHA, N. Maize Genetics 2000 – And Beyond. **The Plant Cell**, Rockville, p. 829-835, 2000.

RUSSEL, W.A.; HALLAUER, A.R. Corn. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. **Hybridization of Crop Plants**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. 766p.

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, v. 68, p.68-69, 1994.

SARI-GORLA, M.; FERRARIO, S.; FRASCAROLI, E.; FROVA, C. Sporophytic response to pollen selection for Alachlor tolerance in maize. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 88, p. 812-817, 1994.

SCAPIM, C.A.; CARVALHO, C.G.P.; CRUZ, C.D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30 n. 5, p. 683-686, 1995.

SENIOR, L. A preliminary look at Simple Sequence Repeats in maize. **Maize Genetics Conference Abstracts**, Lake Geneva, v. 35, n. 40, p. 42, 1993.

SERENO, M.J.C.M; MORAES-FERNANDES, M.I.B; ZANETTINI, M.H.B. Effect os pesticides, fungical diseases and pest on meiotic behavior of wheat. **Revista Brasileira de Genética**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 593-609, 1981.

SHAROPOVA, N.; McMULLEN, M.; SCHULTZ, L.; SCHROEDER, S.; HOUCHINS, K.; DAVIS, G.; BERGSTROM, D.; LISCUM, E.; CONE, K.C.; CHIN, E.; EDWARDS, K.; RUFF, T.G.; LEE, M.; VOGEL, J.M.; BROUWER, C.R. Microsatellites in maize – development and mapping. **Maize Genetics Conference Abstracts**, Lake Geneva, v. 42, n. 87, p. 90, 2000.

SMITH, G.A.; MOSER, H.S. Sporophytic-gametophytic herbicide tolerance in sugarbeet. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 71, p. 231-237, 1985.

SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S. Associations among inbred lines of maize using electrophoretic, chromatographic, and pedigree data. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p. 39-44, 1988.

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

SOUZA, E.; SORRELS, M.E. Relationships among 70 North American Oat Germoplasms: I. Cluster analysis using quantitative characters. **Crop Science**, Madison, v. 31, p. 599-605, 1991.

TAKAHASHI, C.; MARSHALL, J.A.; BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Genomic relationships between maize and its wild relatives. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 1201-1207, 1999.

TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H.; BONIERBALE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology**, Martinsville, v. 7, p. 257-264, 1989.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, p. 205-233, 1993.

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

TEIXEIRA, F.F.; ANDRADE, R.V.; OLIVEIRA, A.C.; FERREIRA, A.S.; SANTOS, M.X. 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.

TERRA, T.F. **Análises citogenéticas e moleculares em populações de milho (*Zea mays* L.), teosinto (*Zea mexicana*) e em híbridos entre as duas espécies**. 2004. 67f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

WANG, R.L.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L.; DOEBLEY, J. The limits of selection during maize domestication. **Nature**, London, v. 398, p. 236-239, 1999.

WELLHAUSEN, E.J.; ROBERTS, L.M.; HERNÁNDEZ, E. **Razas de maíz en México**. México: Secretaria de Agricultura Y Ganadería, 1951. 237p.

WHITE, S.E.; DOEBLEY, J.F. Of genes and genomes and the origin of maize. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 14, n. 8, 1998.

WHITE, S.E.; DOEBLEY, J.F. The molecular evolution of *terminal ear1*, a regulatory gene in the genus *Zea*. **Genetics**, Baltimore, v. 153, p. 1455-1462, 1999.

ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D.; JONES, R.A. Haploid selection for low temperature tolerance of tomato pollen. **Genetics**, Baltimore, v. 101, p. 129-137, 1982.

ZAMIR, D.; GADISH, I. Pollen selection for low temperature adaptation in tomato. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 74, p. 545-548, 1987.

ZHANG, J.; PETERSON, T. Genome rearrangements by nonlinear transposons in maize. **Genetics**, Baltimore, v. 153, p. 1403-1410, 1999.

APÊNDICE 1. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter florescimento masculino. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
34	Comum Amarelo	1018,17	a
20	Amarelão Comum	1013,40	ab
25	Caiano Branco	1004,53	ab
19	Assis Brasil (estaca 31)	1004,53	ab
37	Cunha Sabugo Fino	1004,53	ab
24	Colonial Vermelho	1004,53	ab
12	Brasino	1004,53	ab
2	Cultivar Brancão	1004,53	ab
35	Cunha	995,57	ab
33	Cabo Roxo Misto	995,57	ab
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	995,57	ab
38	Caiano Amarelo	995,57	ab
13	Cabo Roxo	986,70	ab
14	BR – 451 (Testemunha 1)	986,70	ab
31	Caiano Rajado	986,70	ab
16	Branco Duro	986,70	ab
9	Bico de ouro	986,70	ab
10	Cunha	986,70	ab
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	986,70	ab
8	Dente de Cão	986,70	ab
21	Assis Brasil (estaca 16)	986,70	ab
6	Amarelão	986,70	ab
32	Pampa (Testemunha 2)	986,70	ab
30	Roxo Índio	986,70	ab
5	Ferro	986,70	ab
7	8 Carreiras Amarelo	929,83	ab
27	Argentino Flint	929,83	ab
4	Pururuca Branco	929,83	ab
17	POP – 5 (estaca 44)	929,83	ab
26	Branco Argentino	929,83	ab
29	Catete Amarelo	929,83	ab
41	TORK (Testemunha 4)	891,00	ab
18	POP – 5 (estaca 21)	881,83	ab
15	Açoriano Branco	881,83	ab
28	Dente de Ouro	872,97	ab
36	Cunha Sabugo Duplo	872,97	ab
22	Colonial (Santa Eulália – 1)	872,97	ab
39	Sabuguinho Amarelo	827,90	ab
40	NB 3311 (Testemunha 3)	816,30	b
3	Cinquentinha	816,10	b
1	8 Careiras Branco	816,10	b

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.

APÊNDICE 2. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter florescimento feminino. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
39	Sabuguinho Amarelo	1245,90	a
2	Cultivar Brancão	1053,83	ab
13	Cabo Roxo	1053,83	ab
34	Comum Amarelo	1053,83	ab
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	1053,83	ab
36	Cunha Sabugo Duplo	1040,20	ab
33	Cabo Roxo Misto	1042,20	ab
8	Dente de Cão	1040,20	ab
9	Bico de Ouro	1040,20	ab
6	Amarelão	1040,20	ab
35	Cunha	1040,20	ab
12	Brasino	1040,20	ab
5	Ferro	1040,20	ab
14	BR – 451 (Testemunha 1)	1040,20	ab
15	Açoriano Branco	1040,20	ab
16	Branco Duro	1040,20	ab
17	POP – 5 (estaca 44)	1040,20	ab
10	Cunha	1040,20	ab
19	Assis Brasil (estaca 31)	1040,20	ab
24	Colonial Vermelho	1040,20	ab
37	Cunha Sabugo Fino	1040,20	ab
38	Caiano Amarelo	1040,20	ab
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	1040,20	ab
32	Pampa (Testemunha 2)	1040,20	ab
25	Caiano Branco	1040,20	ab
18	POP – 5 (estaca 21)	1040,20	ab
27	Argentino flint	1040,20	ab
30	Roxo Índio	1040,20	ab
31	Caiano Rajado	1040,20	ab
4	Pururuca Branco	1031,23	ab
20	Amarelão Comum	1011,10	ab
29	Catete Amarelo	965,50	b
41	TORK (Testemunha 4)	965,50	b
26	Branco Argentino	965,50	b
7	8 Carreiras Amarelo	965,50	b
28	Dente de Ouro	965,50	b
21	Assis Brasil (estaca 16)	965,50	b
22	Colonial (Santa Eulália – 1)	965,50	b
3	Cinquentinha	890,80	b
1	8 Carreiras Branco	890,80	b
40	NB 3311 (Testemunha 3)	872,97	b

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.

APÊNDICE 3. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter estatura de planta. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
39	Sabuguinho Amarelo	2,8917	a
6	Amarelão	2,5333	ab
2	Cultivar Brancão	2,4667	abc
12	Brasino	2,4583	abc
13	Cabo Roxo	2,4417	abcd
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	2,3875	bcde
31	Caiano Rajado	2,3417	bcdef
9	Bico de Ouro	2,3250	bcdefg
27	Argentino Flint	2,2958	bcdefgh
24	Colonial Vermelho	2,2750	bcdefghi
10	Cunha	2,2417	bcdefghi
26	Branco Argentino	2,2375	bcdefghij
1	8 Carreiras Branco	2,2042	bcdefghijk
32	Pampa (Testemunha 2)	2,1917	bcdefghijk
29	Catete Amarelo	2,1833	bcdefghijk
36	Cunha Sabugo Duplo	2,1583	bcdefghijkl
5	Ferro	2,1583	bcdefghijkl
30	Roxo Índio	2,1500	bcdefghijkl
8	Dente de Cão	2,1333	bcdefghijkl
16	Branco Duro	2,1167	bcdefghijkl
25	Caiano Branco	2,1125	bcdefghijkl
4	Pururuca Branco	2,0833	bcdefghijkl
7	8 Carreiras Amarelo	2,0750	bcdefghijkl
20	Amarelão comum	2,0333	cdefghijkl
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	2,0292	cdefghijkl
3	Cinquentinha	2,0083	cdefghijkl
17	POP – 5 (estaca 44)	2,0042	cdefghijkl
28	Dente de Ouro	2,0000	cdefghijkl
33	Cabo Roxo Misto	1,9639	defghijkl
22	Colonial (Santa Eulália – 1)	1,9292	efghijkl
37	Cunha Sabugo Fino	1,9250	efghijkl
38	Caiano Amarelo	1,8958	fghijkl
40	NB 3311 (Testemunha 3)	1,8917	fghijkl
14	BR – 451 (Testemunha 1)	1,8500	ghijkl
18	POP – 5 (estaca 21)	1,8417	ghijkl
21	Assis Brasil (estaca 16)	1,8333	hijkl
15	Açoriano Branco	1,8042	ijkl
35	Cunha	1,8000	ijkl
34	Comum Amarelo	1,7500	jkl
19	Assis Brasil (estaca 31)	1,7208	kl
41	TORK (Testemunha 4)	1,6833	l

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.

APÊNDICE 4. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter altura de inserção de espiga. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
39	Sabuguinho Amarelo	1,7958	a
6	Amarelão	1,5333	ab
12	Brasino	1,5333	ab
9	Bico de Ouro	1,5250	abc
2	Cultivar Brancão	1,5125	abc
13	Cabo Roxo	1,5042	abc
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	1,4875	abcd
31	Caiano Rajado	1,4750	abcde
27	Argentino Flint	1,4583	abcde
5	Ferro	1,4458	abcdef
26	Branco Argentino	1,4417	abcdef
24	Colonial vermelho	1,3667	abcdefg
10	Cunha	1,3542	bcdefg
16	Branco Duro	1,3500	bcdefg
30	Roxo Índio	1,3458	bcdefg
1	8 Carreiras Branco	1,3292	bcdefg
25	Branco Argentino	1,3208	bcdefg
29	Catete Amarelo	1,3125	bcdefg
4	Pururuca Branco	1,2958	bcdefg
8	Dente de Cão	1,2708	bcdefg
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	1,2333	bcdefg
32	Pampa (Testemunha 20)	1,2250	bcdefg
22	Colonial (Santa Eulália – 1)	1,2083	bcdefg
28	Dente de Ouro	1,1875	bcdefg
38	Caiano Amarelo	1,1875	bcdefg
20	Amarelão Comum	1,1875	bcdefg
7	8 Carreiras Amarelo	1,1792	bcdefg
17	POP – 5 (estaca 44)	1,1708	bcdefg
21	Assis Brasil (estaca 16)	1,1542	bcdefg
37	Cunha Sabugo Fino	1,1542	bcdefg
36	Cunha Sabugo Duplo	1,1417	bcdefg
33	Cabo Roxo Misto	1,1389	bcdefg
3	Cinquentinha	1,1125	bcdefg
34	Comum Amarelo	1,1125	bcdefg
15	Açoriano Branco	1,1083	bcdefg
35	Cunha	1,0958	cdefg
14	BR – 451 (Testemunha 1)	1,0667	defg
19	Assis Brasil (estaca 31)	1,0458	efg
18	POP – 5 (estaca 21)	1,0167	fg
41	TORK (Testemunha 4)	1,0083	g
40	NB 3311 (Testemunha 3)	0,9583	g

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.

APÊNDICE 5. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter número de fileiras de grãos por espiga. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
8	Dente de Cão	23,9167	a
19	Assis Brasil (estaca 31)	17,4000	b
36	Cunha Sabugo Duplo	17,3333	b
10	Cunha	17,0000	b
41	TORK (Testemunha 4)	16,6667	bc
24	Colonial Vermelho	16,3333	bcd
14	BR – 451 (Testemunha 1)	16,1667	bcde
18	POP – 5 (estaca 21)	15,5000	bcdef
40	NB 3311 (Testemunha 3)	14,8333	bcdefg
28	Dente de Ouro	14,1667	bcdefgh
25	Caiano Branco	14,0000	bcdefgh
12	Brasino	14,0000	bcdefgh
23	Colonial (Santa Eulália - 2)	13,8333	bcdefgh
33	Cabo Roxo Misto	13,8333	bcdefgh
17	POP – 5 (estaca 44)	13,8333	bcdefgh
22	Colonial (Santa Eulália – 1)	13,8333	bcdefgh
5	Ferro	13,1667	cdefgh
6	Amarelão	13,1667	cdefgh
32	Pampa (Testemunha 2)	13,1667	cdefgh
2	Cultivar Brancão	13,0000	cdefgh
3	Cinquentinha	12,8333	defghi
9	Bico de Ouro	12,8333	defghi
31	Caiano Rajado	12,6667	defghi
39	Sabuguinho Amarelo	12,5000	efghi
13	Cabo Roxo	12,5000	efghi
4	Pururuca Branco	12,5000	efghi
15	Açoriano Branco	12,3333	fghi
21	Assis Brasil (estaca 16)	12,3333	fghi
20	Amarelão Comum	12,3333	fghi
34	Comum Amarelo	12,0000	fghi
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	11,5000	ghij
29	Catete Amarelo	11,1667	ghij
37	Cunha Sabugo Fino	11,0000	hij
30	Roxo Índio	11,0000	hij
27	Argentino Flint	10,6667	hij
26	Branco Argentino	10,6667	hij
35	Cunha	10,6667	hij
38	Caiano Amarelo	10,6667	hij
16	Branco Duro	10,5000	hij
1	8 Carreiras Branco	9,3333	ij
7	8 Carreiras Amarelo	8,1667	j

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.

APÊNDICE 6. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter comprimento de espiga. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
32	Pampa (Testemunha 2)	21,4170	a
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	20,6670	ab
41	TORK (Testemunha 4)	20,0830	ab
21	Assis Brasil (estaca 16)	19,6670	abc
1	8 Carreiras Branco	19,3330	abcd
37	Cunha Sabugo Fino	19,3330	abcd
9	Bico de Ouro	19,3330	abcd
19	Assis Brasil (estaca 31)	19,1390	abcde
17	POP – 5 (estaca 44)	19,0000	abcde
22	Colonial (Santa Eulália - 2)	18,9170	abcdef
24	Colonial Vermelho	18,7500	abcdef
16	Branco Duro	18,7500	abcdef
30	Roxo Índio	18,6670	abcdef
18	POP – 5 (estaca 21)	18,5830	abcdef
28	Dente de Ouro	18,5000	abcdef
12	Brasino	18,1670	abcdef
6	Amarelão	18,0830	abcdef
34	Comum Amarelo	18,0000	abcdef
2	Cultivar Brancão	17,8330	abcdef
31	Caiano Rajado	17,6670	abcdef
4	Pururuca Branco	17,5830	abcdef
40	NB 3311 (Testemunha 3)	17,5830	abcdef
7	8 Carreiras Amarelo	17,5000	abcdef
5	Ferro	17,5000	abcdef
13	Cabo Roxo	17,4170	abcdef
14	BR – 451 (Testemunha 1)	17,4170	abcdef
26	Branco Argentino	17,3333	abcdef
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	17,0830	abcdef
27	Argentino Flint	17,0830	abcdef
29	Catete Amarelo	17,0830	abcdef
20	Amarelão Comum	16,8330	abcdef
36	Cunha Sabugo Duplo	16,2500	abcdef
15	Açoriano Branco	16,1670	abcdef
10	Cunha	16,1670	abcdef
39	Sabuguinho Amarelo	15,3330	bcdef
8	Dente de Cão	15,2500	bcdef
25	Caiano Branco	15,0000	bcdef
3	Cinquentinha	14,1670	cdef
33	Cabo Roxo Misto	13,8330	def
38	Caiano Amarelo	13,5000	ef
35	Cunha	13,2500	f

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.

APÊNDICE 7. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter acamamento. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
35	Cunha	15,1000	a
15	Açoriano Branco	7,4670	ab
4	Pururuca Branco	7,4000	ab
8	Dente de Cão	4,0000	ab
26	Branco Argentino	2,7000	ab
6	Amarelão	2,3670	b
32	Pampa (Testemunha 2)	1,9670	b
16	Branco Duro	1,7670	b
21	Assis Brasil (estaca 16)	1,7000	b
29	Catete Amarelo	1,4330	b
30	Roxo Índio	1,2000	b
28	Dente de Ouro	1,1330	b
36	Cunha Sabugo Duplo	1,1000	b
39	Sabuguinho Amarelo	0,9000	b
27	Argentino Flint	0,8670	b
1	8 Carreiras Branco	0,0000	b
9	Bico de Ouro	0,0000	b
17	POP – 5 (estaca 44)	0,0000	b
19	Assis Brasil (estaca 31)	0,0000	b
2	Cultivar Brancão	0,0000	b
5	Ferro	0,0000	b
18	POP – 5 (estaca 21)	0,0000	b
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	0,0000	b
22	Colonial (Santa Eulália – 1)	0,0000	b
25	Caiano Branco	0,0000	b
10	Cunha	0,0000	b
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	0,0000	b
12	Brasino	0,0000	b
13	Cabo Roxo	0,0000	b
14	BR – 451 (Testemunha 1)	0,0000	b
31	Caiano Rajado	0,0000	b
24	Colonial Vermelho	0,0000	b
33	Cabo Roxo Misto	0,0000	b
34	Comum Amarelo	0,0000	b
3	Cinquentinha	0,0000	b
20	Amarelão Comum	0,0000	b
37	Cunha Sabugo Fino	0,0000	b
38	Caiano Amarelo	0,0000	b
7	8 Carreiras Amarelo	0,0000	b
40	NB 3311 (Testemunha 3)	0,0000	b
41	TORK (Testemunha 4)	0,0000	b

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.

APÊNDICE 8. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter rendimento de espiga. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
41	TORK (Testemunha 4)	4,1498	a
24	Colonial Vermelho	41449	a
40	NB 3311 (Testemunha 3)	4,1078	ab
21	Assis Brasil (estaca 16)	3,9967	ab
13	Cabo Roxo	3,9617	ab
27	Argentino Flint	3,9595	ab
6	Amarelão	3,9400	ab
9	Bico de Ouro	3,8983	ab
26	Branco Argentino	3,8954	ab
31	Caiano Rajado	3,8842	ab
8	Dente de Cão	3,8839	ab
12	Brasino	3,8838	ab
36	Cunha Sabugo Duplo	3,8800	ab
14	BR – 451 (Testemunha 1)	3,8791	ab
29	Catete Amarelo	3,8668	ab
3	Cinquentinha	3,8589	ab
30	Roxo Índio	3,8371	ab
10	Cunha	3,8122	abc
32	Pampa (Testemunha 2)	3,7982	abc
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	3,7869	abc
17	POP – 5 (estaca 44)	3,7802	abc
16	Branco Duro	3,7616	abc
5	Ferro	3,7517	abc
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	3,7470	abc
2	Cultivar Brancão	3,7366	abc
22	Colonial (Santa Eulália – 1)	3,6978	abc
1	8 Carreiras Branco	3,6849	abc
15	Açoriano Branco	3,6735	abc
19	Assis Brasil (estaca 31)	3,6720	abc
18	POP – 5 (estaca 21)	3,6441	abc
25	Caiano Branco	3,5990	abc
4	Pururuca Branco	3,5837	abc
38	Caiano Amarelo	3,5606	abc
7	8 Carreiras Amarelo	3,4276	abc
34	Comum Amarelo	3,3854	abc
33	Cabo Roxo Misto	3,3350	abc
35	Cunha	3,3082	abc
37	Cunha Sabugo Fino	3,2095	abc
28	Catete Amarelo	2,6699	abc
20	Amarelão Comum	2,1477	bc
39	Sabuguinho Amarelo	1,8450	c

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.

APÊNDICE 9. Médias de 42 genótipos de milho referentes a análise do caráter rendimento de grãos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2005.

Genótipo	Cultivar	Médias	
41	TORK (Testemunha 4)	12640	a
24	Colonial Vermelho	11069	ab
6	Amarelão	8066	abc
40	NB 3311 (Testemunha 3)	7715	abc
21	Assis Brasil (estaca 16)	7667	abc
13	Cabo Roxo	7637	abc
27	Argentino Flint	7233	abc
36	Cunha Sabugo Duplo	6570	abc
31	Caiano Rajado	6551	abc
8	Dente de Cão	6316	abc
9	Bico de Ouro	6211	abc
12	Brasino	6095	abc
3	Cinquentinha	9041	abc
10	Cunha	5907	abc
14	BR – 451 (Testemunha 1)	5881	abc
29	Catete Amarelo	5714	abc
19	Assis Brasil (estaca 31)	5699	abc
30	Roxo Índio	5492	abc
28	Dente de Ouro	5299	abc
32	Pampa (Testemunha 2)	5250	abc
23	Colonial (Santa Eulália – 2)	5241	abc
26	Branco Argentino	5183	abc
11	Sabuguinho ou Mato Grosso	5153	abc
17	POP – 5 (estaca 44)	4689	abc
5	Ferro	4618	abc
22	Colonial (Santa Eulália – 1)	4463	abc
2	Cultivar Brancão	4400	abc
16	Branco Duro	4349	abc
18	POP – 5 (estaca 21)	4114	abc
1	8 carreiras Branco	4028	abc
15	Açorino Branco	3955	abc
34	Comum Amarelo	3862	abc
25	Caiano Branco	3577	bc
20	Amarelão Comum	3243	bc
4	Pururuca Branco	3131	bc
38	Caiano Amarelo	2651	bc
7	8 Carreiras Amarelo	2359	bc
35	Cunha	2293	bc
33	Cabo Roxo Misto	2038	c
37	Cunha Sabugo Fino	1702	c
39	Sabuguinho Amarelo	191	c

Teste de Tukey: médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes a 5 %.