

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

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM MILHO (*Zea mays* subsp.
mays), TEOSINTO (*Zea mays* subsp. *mexicana*) E EM SEUS HÍBRIDOS

Cícero Carlos de Souza Almeida
Engenheiro Agrônomo/UFAL

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Janeiro de 2003

A minha família pelo
constante incentivo, amor e carinho!

Agradecimentos

A Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização deste estudo.

A professora Maria Jane Cruz de Melo Sereno, pela orientação, apoio, carinho e dedicação.

Ao professor José Fernandes Barbosa Neto, pelos esclarecimentos das dúvidas durante a realização do trabalho.

Ao colega Sérgio dos Anjos Silva, pela amizade e participação na realização deste trabalho.

Aos colegas Edson Amorim, Alexandre Volts, Paulo Fagundes, Danielle Serafin, Paulo Roberto, Alexandra Minossi, Cláudia Lemons, Léo Duc, Rúbia Coser, Osmar Conte.

Ao CNPQ e CAPES pelo apoio financeiro durante a realização do curso.

À Deus.

A minha mãe (Valci Francisca), ao meu padastro (Sebastião Bernardino), aos meus irmãos (Marcos Paulo, Marcílio de Souza e Moana Vitória), aos meus avós (Leonel Francisco e Izabel Maria) e a Joseane Barbosa pelo apoio, incentivo, amor e carinho.

A minha professora e orientadora de Iniciação Científica Alice Calheiros de Melo Espíndola, pelo grande apoio e incentivo durante minha Graduação.

A todos que contribuíram com a realização deste trabalho.

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM MILHO (*Zea mays* subsp. *mays*), TEOSINTO (*Zea mays* subsp. *mexicana*) E EM SEUS HÍBRIDOS¹

Autor: Cícero Carlos de Souza Almeida

Orientador: Prof^a Maria Jane Cruz de Melo Sereno.

RESUMO

O milho é uma planta anual cultivada em quase todo o mundo, consumida como ração para animais e na alimentação humana através de produtos industrializados e *in natura*. Existem diversos programas de melhoramento de milho no Brasil, mas no Sul são poucos os grupos que trabalham com este cereal. O desenvolvimento de populações tem sido efetuado por instituições de pesquisas, enquanto híbridos têm sido feitos por companhias privadas. A variabilidade genética num programa de melhoramento assume uma grande importância, já que é o ponto de partida para o progresso genético. Em algumas espécies, a variabilidade genética torna-se estreita a cada ciclo de seleção, diminuindo futuros progressos genéticos. Uma alternativa de ampliar a variabilidade é através de cruzamentos amplos com espécies silvestres. Estudos indicam que as espécies de teosinto são uma potencial fonte de variabilidade para importantes características agronômicas. Porém, o desenvolvimento de variedades de milho bem adaptadas, com boas características agronômicas e de rendimento, oriundas de cruzamentos com espécies silvestres necessita de um amplo estudo genético, molecular e citogenético. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética em genótipos de milho e teosinto através de marcadores moleculares e analisar a nível citogenético as populações de milho, teosinto e seus híbridos. Foi detectada variabilidade genética nas populações de milho e teosinto, sendo a população de teosinto a que apresentou maior variabilidade. Os genótipos de milho e teosinto apresentaram uma alta estabilidade meiótica, enquanto os híbridos entre milho e teosinto tiveram associações de univalentes, aderência de cromossomos, pontes e menor frequência de quiasmas. Os resultados foram suficientes para indicar que é possível utilizar o teosinto como fonte genética em programas de melhoramento de milho.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (47 p.). Janeiro, 2003.

CYTOGENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS IN MAIZE (*Zea mays* subsp. *mays*), TEOSINTE (*Zea mays* subsp. *mexicana*) AND IN IT'S HYBRIDS¹

Author: Cícero Carlos de Souza Almeida

Adviser: Prof^a Maria Jane Cruz de Melo Sereno.

ABSTRACT

The maize is an annual plant cultivated in almost whole world, consumed as rations for animals and in the human feeding through industrialized products and in natura. In Brazil, exist diverse breeding programs of maize, but in the south few groups work with this cereal. The development of populations has been effected by institutions of research, while hybrid has been made for private company. The genetic variability in an breeding program assumes a great importance, since it is the starting point for the genetic progress. In some species, the genetic variability become it narrow each selection cycle, decreasing future genetic progress. An alternative to extend the variability is through broal crossings with wild species. Studies indicate that teosinte is a potential source of variability for important agronomic characteristics. However, the development of maize varieties well adapted, with good agronomics characteristics and income, deriving from of crossings with wild species needs more genetic, molecular and cytogenetic studies. The objective of this work was to characterize the genetic variability in maize genotypes and teosinte through molecular markers and to analyze the cytogenetic the maize populations, teosinte and in its hybrids. Genetic variability was detected in the maize populations and teosinte, being the teosinte population the one that presented larger variability. The maize and teosinte genotypes had presented high stability meiotic, while the hybrids between maize and teosinte had frequency of univalents, adherence of chromosomes, bridges and smaller quiasmas frequency. The results were enough to indicate that it is possible to use teosinte as genetic source in maize breeding.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (47 p.). January, 2003.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Origem do milho.....	04
1.2 Variabilidade genética em milho e teosinto.....	06
1.3 Estimativa de variabilidade genética.....	11
1.4 Caracterização citogenética.....	13
1.5 Citogenética de teosinto e milho.....	15
2. VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MILHO E TEOSINTO ESTIMADA ATRAVÉS DE MICROSSATÉLITES (SSR).	19
2.1 Introdução.....	19
2.2 Materiais e Métodos.....	20
2.3 Resultados e Discussão.....	22
2.4 Conclusões.....	28
3. ANÁLISE CITOGENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MILHO, TEOSINTO E EM SEUS HÍBRIDOS.....	29
3.1 Introdução.....	29
3.2 Materiais e Métodos.....	31
3.3 Resultados e Discussão.....	34
3.4 Conclusões.....	42
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Primers de microssatélites, número e tamanhos dos alelos por locus e grau de polimorfismos (PIC). Faculdade de Agronomia - UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.....	24
2. Distribuição dos alelos e variabilidade genética dentro das populações Suwan, Pampa, BR400, BR402 e Teosinto, utilizando 10 <i>primers</i> de microssatélites. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.....	25
3. Análise de Variância Molecular (Amova) das frequências alélicas de 10 genes em cinco populações (Suwan, BR400, BR402, Pampa e Teosinto). Faculdade de Agronomia/UFRGS, 2002.....	26
4. Comportamento cromossômico em diacinese em genótipos de milho, teosinto e em seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.....	35
5. Comportamento cromossômico em metáfase I em genótipos de milho, teosinto e em seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.....	36
6. Índice meiótico e viabilidade de pólen em genótipos de milho, teosinto e seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.....	37
7. Estabilidade citogenética em genótipos de milho, teosinto e seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.....	39
8. Número médio de crossing-over em diferentes genótipos de milho, teosinto e em seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.....	41

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Agrupamento obtido da matriz de distância genética, baseado no coeficiente de NEI72. Considerando 10 <i>primers</i> de microssatélites. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.....	27
2. Comportamento meiótico em milho, teosinto e em seus híbridos. Diacinese (A), metáfase I (B), tétrade (C), pólen imaturo (D). cromossomos retardatários (E) e dois grupos de cinco bivalentes (F). Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002. (10 μm).....	38
3. Anomalias em híbrido entre milho e teosinto. Aderência de cromossomos(A), dessinapse (B), univalentes (C e D), ponte em anáfase I (E) e tétrade com ausência de núcleo (F). Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002. (10 μm).....	40

1. Introdução Geral

O milho (*Zea mays* subsp. *mays*) é uma planta de ciclo anual, cultivada em quase todo o mundo, com uma produção média de 605,65 milhões de toneladas (IBGE - 99/0). Os Estados Unidos é o maior produtor com cerca de 43%, em segundo a China com 17,93% e em terceiro o Brasil com 6,97% ocupando uma área colhida de 13 milhões de hectares, atingindo uma produtividade média de 3117 kg/ha (IBGE – Mar/01). Para o Mercado Comum do Sul (Mercosul) o Brasil participa com cerca de 71,7% do total de milho comercializado e produzido praticamente em todo território Nacional. O milho é um alimento altamente energético e apresenta um teor de proteína na faixa de 9 a 11%. Esta cultura é consumida de diversas formas: no consumo de rações para aves, suínos, bovinos e pequenos animais; e para consumo humano através de produtos industrializados e produtos *in natura* (Amorim, 2002)

No Rio Grande do Sul, o milho possui significativa importância sócio-econômica ocupando uma boa parte da área semeada com cultivos de primavera-verão, contribuindo com cerca de 35% da produção gaúcha de grãos, considerando cereais, leguminosas e oleaginosas.

Existem diferentes programas de melhoramento de milho em regiões do Brasil, mas no Sul poucos grupos estão trabalhando com este cereal. O desenvolvimento de populações e de novas variedades tem sido efetuado por instituições oficiais de pesquisa e o desenvolvimento de híbridos tem sido feito por companhias privadas de sementes com lançamento de materiais de boa qualidade. A Universidade tem um papel fundamental em desenvolver estudos em áreas não abrangidas por estas companhias mas também com aplicações

práticas. O Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul iniciou um Programa de Melhoramento Genético de Milho no ano de 1998 e já possui resultados iniciais significativos nas áreas de resistência a moléstias, resposta a fatores abióticos e desenvolvimento de populações.

Dos três pontos básicos da evolução de qualquer espécie descritos por Stebbins *et al.* (1971), a variabilidade genética assume um papel fundamental no que se relaciona com o progresso genético. A ausência de variabilidade genética, implica diretamente na inviabilidade do sucesso genético e como consequência restringe a utilização dos outros dois componentes evolutivos, que são a seleção e o ajustamento das constituições genéticas aos diferentes ambientes disponíveis (Allard, 1960).

O desenvolvimento de variedades de milho bem adaptadas, com boas características agronômicas e com alto rendimento, oriundas de hibridações com espécies ancestrais necessita de um amplo estudo e de um tempo relativamente longo. O trabalho inicial para atingir este objetivo deve necessariamente incluir o estudo da diversidade existente em raças, incluindo a análise de caracteres morfológicos, citogenéticos e moleculares.

Para a maioria das espécies a variabilidade genética torna-se estreita a cada ciclo de melhoramento, diminuindo futuros sucessos em seleção e ganho genético. Algumas culturas têm a capacidade de ampliar a variabilidade através de fenômenos como epistasia, mutação e recombinação. Para características que não apresentem grande variabilidade genética, uma das maneiras de aumentá-la é através de cruzamentos amplos com espécies silvestres relacionadas.

A utilização de cruzamentos amplos num programa de melhoramento tem importância uma vez que podem ser obtidos genes de interesse oriundos de espécies silvestres. Entretanto, para que uma cultivar tenha importância do ponto de vista econômico, torna-se necessário o desenvolvimento de genótipos bem adaptados, produtivos, possuidores de boas características agronômicas e específicas de grão.

O teosinto é uma espécie que entrou na rota evolutiva do milho e o estudo deste germoplasma, nas condições do Sul do Brasil, envolvendo análises agronômicas, citogenéticas e molecular da espécie e de híbridos oriundos de hibridização com o milho poderá adicionar informações significativas nas áreas de melhoramento e de evolução de plantas, possuindo um grande potencial para introgressão de genes para vários caracteres agronômicos como resistência a pragas, moléstias e tolerância ao encharcamento.

A citogenética é a ciência que estuda todo e qualquer comportamento relativo a cromossomos isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação; bem como na sua variação e evolução durante a transmissão generativa (meiose) e somática (mitose) (Guerra, 1988). A análise citogenética é fundamental em qualquer programa de melhoramento, pois através destes estudos é possível determinar o número e o comportamento dos cromossomos, níveis de ploidia, fertilidade dos grãos de pólen, auxiliando na identificação e escolha de materiais para serem utilizados em cruzamentos dirigidos (Hanna, 1980; Sybenga, 1993, 1998).

A análise citogenética para estudos de regularidade meiótica pode ser útil na avaliação da possibilidade de transferência de genes de interesse entre

milho e espécies relacionadas.

Em termos de análises citogenéticas e moleculares ocorre uma deficiência de informações no que diz respeito dos genótipos de milho comum e doce cultivados no estado do Rio Grande do Sul. Em relação ao teosinto não foi obtida nenhuma informação sobre estudos agronômicos, genéticos, citogenéticos e moleculares no Brasil. Assim, as espécies de milho e teosinto oferecem inúmeras oportunidades para a análise de variabilidade genética a nível molecular, como também para o estudo de seus cromossomos, no sentido de identificar alelos de interesse agronômico e cruzamentos entre milho e teosinto que sejam mais estáveis em nível citológico.

1.1 Origem do milho

O gênero *Zea* L. é composto de um grupo de gramíneas anuais e perenes nativas do México e América Central. O gênero inclui tanto germoplasma silvestre como o teosinto e o quanto cultivado como o milho. Goodman (1995) fez uma revisão sobre a evolução do milho onde aponta algumas hipóteses sugeridas por diferentes autores. Uma é a de que o milho, teosinto e *tripsacum* são descendentes de um ancestral comum, sendo que o último teria se diferenciado bem mais precocemente do que milho e teosinto.

A segunda hipótese é que o milho é derivado do teosinto. Esta sugestão de Galinat (1973) tem sido a mais aceita e trabalhos recentes envolvem a identificação da provável raça ancestral de teosinto. Outra hipótese, é que alguns caracteres em teosinto estariam mais especializados do que em milho, sugerindo que o teosinto é que teria se originado da hibridização entre *tripsacum* e milho (Doebley e Stec, 1991).

A Hipótese Tripartite (Mangesldorf e Reeves, 1939) propõe que o

ancestral do milho foi um milho pipoca silvestre extinto; que o teosinto se originou de hibridização entre milho e tripsacum; e que a introgressão com teosinto e tripsacum originaram a síndrome de característica tripsacoide das modernas raças de milho.

Mais recentemente, algumas evidências apoiam a origem tetraplóide do milho. Análises de isoenzimas e estudos com RFLP têm demonstrado que o genoma de milho contém segmentos cromossômicos duplicados. Naranjo *et al.* (1990) registram que o número cromossômico básico é $X = 5$ para o gênero *Zea*.

A segregação de caracteres que diferenciam milho e teosinto foi analisada em populações oriundas de três gerações de F2 e de três retrocruzamentos entre milho e tesinto (Szabo e Burr, 1996). As análises de RFLP indicaram que o milho se diferenciou de teosinto através de mudanças em apenas cinco genes com grande efeito no fenótipo.

Diferentes hibridações foram realizadas entre raças e populações de milho, teosinto perene (*Z. diploperennis*), três espécies de teosinto anual (*Z. parviglumis*, *Z. mexicana*, *Z. luxurians*) e *Tripsacum*. Análises de RFLP indicaram que 21 locos possuíam alelos comuns entre milho e tripsacum que não estavam presentes em teosinto, sugerindo uma evolução reticulada, com progênies oriundas de cruzamentos entre as duas primeiras espécies (Eubanks, 1999).

Wang *et al.* (1999) analisaram a domesticação do milho, mostrando os efeitos da seleção em genes reguladores e como os efeitos do prolongado período de domesticação influenciaram na manutenção da variabilidade genética. Segundo os autores, o milho teria sido domesticado do teosinto (*Zea*

mays subsp *parviglumis*) no México.

Também Paabo (1999) concluiu que alguns alelos de teosinto mais relacionados ao milho são derivados de *Zea mays* subsp *Parviglumis*.

Ainda segundo Gaut *et al.* (2000) as duplicações resultaram de um evento poliplóide que ocorreu cerca de 11 milhões de anos e que este evento aconteceu após a divergência entre sorgo e milho, com posterior rearranjo genômico e diploidização .

De qualquer maneira, o teosinto é uma gramínea que certamente entrou na rota evolutiva do milho e tem possibilidades de contribuir com genes agronomicamente importantes no melhoramento genético do milho.

1.2 Variabilidade genética em milho e teosinto

A variabilidade genética existente na cultura do milho é bastante ampla e está organizada em grupos raciais (Brown e Goodman, 1977). Uma raça de milho foi definida como um grupo de indivíduos que apresentavam certas características em comum, as quais permitiam o seu reconhecimento como um grupo (Anderson e Cutler, 1942). Os mesmos autores conceituaram que em termos genéticos uma raça seria caracterizada por apresentar um significativo número de genes em comum. Um grande número de raças de milho tem sido descrito, sendo que o entendimento desta variabilidade é importante para inferir a história evolutiva da cultura e auxiliar no planejamento de programas de melhoramento minimizando, desta forma, o problema de vulnerabilidade genética e reduzindo a quantidade de cruzamentos que devem ser realizados a cada ano (Brown e Goodman, 1977).

Dentre as raças de milho existentes, algumas são consideradas como mais importantes. Entre elas a raça Tuxpeño é originária da costa sul do México e tem influência em grande número de raças consideradas mais modernas, como Celaya, Chalqueño e Cônico. Suas características principais são plantas de elevada estatura, ciclo tardio, espigas grandes, grãos dentados e alta produtividade. Atualmente existem populações de Tuxpeño melhoradas para baixa estatura, como Tuxpanito. Outra raça de grande importância para o melhoramento de milho tropical é o complexo denominado Cateto, o qual apresenta espigas pequenas e de grãos duros alaranjados ou avermelhados, plantas prolíficas e com resistência a insetos e moléstias (Brown e Goodman, 1977). Este complexo tem ocorrência desde a América Central até a América do Sul. Da mesma forma, a raça Coastal Tropical Flint tem sido bastante utilizada em programas de melhoramento. Ela está distribuída na região do Caribe, sendo constituída por populações de grãos duros, espigas grandes e plantas altas (Brown e Goodman, 1977).

Com relação a populações de milho cultivadas em ambientes de clima temperado, a raça US Corn Belt pode ser considerada como a de maior importância. Esta raça é de desenvolvimento recente, sendo originária do cruzamento de populações de Southern Dent com populações de Northern Flint (Brown e Goodman, 1977). As plantas provenientes desta raça apresentam, em geral, espigas de coloração vermelha, grãos dentados amarelos e com pendões grandes e ramificados. A cultura de milho híbrido nos Estados Unidos está totalmente baseada na exploração desta raça, existindo muitas subdivisões; entre elas é possível destacar as populações Lancaster e Reid.

Como pode ser evidenciado, existe variabilidade genética para caracteres

morfo-agronômicos, indicando a possibilidade de sucesso em ganhos genéticos num programa de melhoramento da espécie.

Por outro lado, diferentes autores têm estudado características agronômicas em espécies relacionadas na tentativa de utilização como fonte de genes importantes para o milho domesticado, como resistência a pragas e doenças. Entre as espécies próximas está o teosinto, composto de uma série de subespécies, entre elas *Zea diploperennis*, *Zea mays* subsp. *parviglumis* e *Zea mays* subsp. *mexicana*, com uma variabilidade genética ampla a ser estudada e posteriormente transferida para *Zea mays* subsp. *mays*.

Podol'skaya (1988) analisou o diplóide *Zea diploperennis* em programas de melhoramento de milho. Nestes trabalhos identificou que os híbridos entre milho e teosinto apresentavam $2n = 20$ cromossomos e poderiam hibridizar sem barreiras de isolamento reprodutivo. Ressaltou a importância deste germoplasma uma vez que possui genótipos resistentes a vírus importantes para a cultura.

Pasztor e Borsos (1990) analisaram a herança e composição química de híbridos de milho (*Zea mays*L) X teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana* Schrader / Iltis). Os híbridos F1 e F2 foram superiores em estatura em relação aos pais e cerca de 40 a 50 % dos F1 foram similares ao teosinto, com bastante afilhamento enquanto outros não possuíam afilhos. Dois fenótipos principais foram relacionados: um com muitos afilhos e pequenas espigas e outro sem afilhos e uma espiga maior. Apresentavam genótipos precoces ou muito precoces, alguma resistência a *Fusarium* (*Fusarium moniliforme*), broca (*Ostrinia nubilalis*) e conteúdo superior de lisina, ácido aspártico entre outros. Estes resultados mostraram a importância de genótipos de teosinto para o

melhoramento de milho.

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

Gevers e Lake (1994) analisaram o gene GLS1 para resistência a moléstia causada pelo fungo *Cercospora – zaeae – maydis*, uma doença que está aumentando em importância em países onde o clima é quente e úmido como em regiões dos Estados Unidos, África e Brasil. A resistência foi encontrada em genótipos de linhagens de milho da África do Sul, em duas fontes de teosinto anual (*Zea mays* subsp. *mexicana*) e em um tipo de milho com espigas terminais geneticamente recessivo. Os resultados obtidos indicaram a possibilidade de introgressão deste caráter em germoplasmas cultivados de milho.

Importantes pesquisas foram realizadas envolvendo o efeito do citoplasma de espécies relacionadas. A influência da variação citoplasmática em milho (*Zea mays* L.) já é conhecida para caracteres qualitativos mas os genes quantitativos são difíceis de serem avaliados. Neste sentido, Edwards *et al.* (1996) estudaram os efeitos de diversos citoplasmas de teosinto em caracteres quantitativos de duas linhagens de milho, identificando influência de 5 dos 11 citoplasmas testados. Três decresceram a produtividade e outros citoplasmas interagiram com núcleos específicos indicando que os genomas citoplasmáticos de teosinto interagem com genomas nucleares de milho.

Os mesmos autores avaliaram a importância dos efeitos citoplasmáticos

de teosinto em plantas híbridas com núcleos de milho. As citolinhas foram desenvolvidas pela transferência de 11 citoplasmas em pelo menos seis gerações de retrocruzamentos. Os onze citoplasmas de teosinto decresceram o rendimento em torno de 2,2 % mostrando que a substituição não trouxe os efeitos desejáveis para os híbridos de milho.

Alguns trabalhos têm mostrado que alguns caracteres agrônômicos importantes não foram selecionados pelo homem durante a domesticação (Swarup *et al.*, 1995). Segundo os autores, genes para alto conteúdo de metionina não foram selecionados de teosinto para o milho moderno e poderiam assim ser aproveitados pelo melhoramento genético

Por outro lado, o teosinto e algumas populações de milho mostraram maior sensibilidade ao alumínio quando comparadas com outros genótipos da mesma espécie (Llugany *et al.*, 1994) mostrando assim a importância de testar diferentes introduções destes germoplasmas.

Um importante trabalho foi desenvolvido por Zhou *et al.* (1997) onde 14 linhagens foram geradas após oito gerações de autofecundação e seleção de um cruzamento entre milho e teosinto realizado em 1990. As linhas foram resistentes a moléstias, insetos e a estresses ambientais. Os híbridos com milho usados como testadores mostrou forte heterose, indicando a potencialidade de hibridização entre milho e teosinto para ampliar o germoplasma de milho.

Onze linhas de milho Havaiano foram cruzadas com teosinto diplóide perene (*Zea diploperennis*) identificados no México. Os híbridos F1 possuíam caracteres de espiga intermediários entre os pais, com fileiras de quatro grãos por espiga. A geração F2 mostrou uma ampla segregação e houve também

uma rápida reversão ao tipo do milho cultivado através de poucos retrocruzamentos. Este resultado é promissor uma vez que possibilita a transferência de genes de resistência a moléstias e insetos de teosinto para milho, com possibilidade de rápida recuperação do tipo domesticado (Srinivasan e Brewbaker, 1999).

Desta maneira, ficou evidenciado que o teosinto tem potencial para ser utilizado como fonte de importantes caracteres agronômicos e com possibilidades de hibridização e introgressão de genes por ser um ancestral ou derivado taxonômico do milho cultivado.

1.3 – Estimativa de variabilidade genética

A variabilidade pode ser estimada de diversas maneiras: com dados morfológicos e recentemente dados bioquímicos e moleculares. Estimativas utilizando dados morfológicos são menos eficientes comparados com estimativas provenientes de dados moleculares, porque as características morfológicas com baixa herdabilidade são fortemente afetados pelo ambiente, influenciando na estimativa da variabilidade. Os marcadores moleculares têm a vantagem de estimar a real variabilidade existente, devido ao fato de não serem influenciados pelo ambiente, apresentando 100% de herdabilidade e para alguns marcadores são herdados de forma codominante, sendo que raramente exibem interações epistásticas ou pleitrópicas.

Vários métodos moleculares têm sido desenvolvido com o propósito de caracterizar diversidade genética em germoplasma de plantas cultivadas. O primeiro método desenvolvido para identificação de marcadores baseados em DNA foi o RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Este baseia-se na

diferença de comprimentos de DNA gerados quando clivados com a mesma enzima, diferindo no tamanho de pares de bases entre indivíduos, devido a possíveis alterações nos sítios de restrição, como deleções, translocações e inversões.

Com a descoberta da PCR (*polimerase chain reaction*) vários marcadores foram desenvolvidos como o RAPD (*random amplified polymorphism DNA*) que utiliza iniciadores (*primers*) arbitrários que amplificam seqüências-alvos desconhecidas. O AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) baseia-se na clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição, seguida da ligação com adaptadores específicos, uma pré-amplificação, seguido de uma amplificação seletiva via PCR com *primers* específicos e separação dos fragmentos gerados em gel de alta resolução.

Outra técnica intensamente utilizada são os SSR (*Simple sequence repeats*) ou microssatélites que são seqüências simples repetidas variando de 2 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidos lado a lado (Senior, *et al.*, 1998). Esse tipo de marcador apresenta características peculiares como: herança codominante, identifica múltiplos alelos, eficiente para formar banco de dados e potencial para correr múltiplas reações (Lübberstent, 1998).

Nas últimas décadas, numerosos estudos têm sido conduzidos com milho para estimar distancia genética, diversidade e discriminação entre linhas baseadas em marcadores polimórficos de DNA e proteínas (Senior *et al.*, 1998). Marcadores moleculares são úteis para a identificação de materiais selvagens e para seleção na intogressão de relevantes regiões genômicas a partir de espécies selvagens pelo processo de retrocruzamento. (Lübberstedt *et al.*, 1998).

1.4 Caracterização citogenética

A espécie *Zea mays* L., por ser uma cultura importante, possui uma gama de trabalhos referentes a análises de cromossomos nas divisões celulares e em diferentes condições ambientais. O milho é uma espécie que possui $2n = 20$ cromossomos, com meiose regular e a maioria dos genótipos possui boa formação de grãos de pólen.

A análise da divisão meiótica em diferentes genótipos de milho é importante, pois é um processo que envolve uma série de fenômenos mecânicos e bioquímicos de considerável complexidade que culmina na redução do número cromossômico. Cada passo desta divisão celular é geneticamente controlado tanto em animais como em plantas. O controle meiótico da meiose foi estudado por e Golubovskya(1979), que descreveu mutantes meióticos desde eucariotos inferiores até plantas superiores e o homem. Em milho, mutantes naturais e induzidos têm sido descritos, os quais afetam muitas fases da meiose (Golubovskaya, 1989).

Muitos aspectos da genética e citogenética do milho podem ser analisados com o conhecimento completo do desenvolvimento do gametófito. (Rhoades, 1951). Desvios na transmissão, segregação e ligação são afetados pelo desenvolvimento do gametófito.

Neste sentido, Chang e Neuffer (1989) descreveram detalhadamente a microsporogênese em milho correlacionando os diferentes estádios com as características de desenvolvimento do pendão. Mudanças morfológicas no comprimento do pendão, florete, e antera foram correlacionados com seis estádios citologicamente definidos da microsporogênese : pré-meiose, meiose,

estádio uninucleado, primeira mitose do pólen, segunda mitose do pólen e pólen maduro.

A meiose é um evento de alta estabilidade evolutiva, e plantas alógamas, como o milho, tem um grau de heterozigose, o que assegura uma meiose normal. Quando esta heterozigose é quebrada pela endogamia algumas anormalidades podem se tornar freqüentes. Muitas destas anormalidades são causadas por mutações em genes ou grupos de genes que controlam cada fase da meiose (Golubovskaya, 1979, 1989).

Os mutantes meióticos (*mei*) podem ser caracterizados por seus efeitos nos diferentes processos citogenéticos. Existem mutações que bloqueiam totalmente a meiose, afetam a sinapse, desinapse, a frequência de crossing-over e a disjunção de cromossomos. Outros mutantes *mei* também causam a formação de sincitos, ausência de citocinese e irregularidades de fuso (Caetano-Pereira *et al.*, 1997).

Em programas de melhoramento de milho, a autofecundação pode conduzir ao aparecimento de uma série de anomalias em linhagens a serem empregadas em hibridizações. Uma alteração importante como a macho-esterilidade parcial foi detectada numa linhagem submetida a seis ciclos de autofecundação (Defani-Scoarize *et al.*, 1996). Neste trabalho a análise de inflorescências masculinas evidenciou uma série de aberrações citológicas como cromossomos univalentes, segregação irregular em meiose I e II, micronúcleos, degeneração de cromatina, fusos anormais, micrósporos multinucleados e grãos de pólen de variados tamanhos. Este é um resultado significativo, indicando os efeitos da autofecundação a nível citológico.

Assim, é observado que, de maneira geral, várias anomalias na meiose

ocorrem em milho decorrentes de autofecundações, estresses ambientais, hibridizações intra ou interespecíficas.

Conseqüentemente, é de significativa importância uma análise das diferentes raças e/ou populações que estão sendo introduzidas no programa de melhoramento de milho comum e doce, uma vez que estes germoplasmas entrarão em blocos de cruzamentos com o objetivo de aumentar o rendimento e/ou qualidade dos produtos a serem lançados no mercado.

1.5 Citogenética de teosinto e milho

Podol'skaya em 1988, publicou pesquisas envolvendo o diplóide *Zea diploperennis* em programas de melhoramento de milho. Nestes trabalhos identificou que os híbridos entre milho e teosinto apresentavam $2n = 20$ cromossomos e poderiam hibridizar sem barreiras de isolamento reprodutivo. Uma análise citológica foi feita em 26 coleções de *Coix spp*, 6 de *Zea mays* e 3 de teosinto (*Zea spp*) (Katiyar e Sachan, 1992). Não foi detectada nenhuma característica cariomorfológica comum entre os genomas de *Coix* e *Zea*, mas cromossomos com morfologias similares ao milho foram obtidas com teosinto.

Os “knobs” são estruturas celulares presentes no núcleo de células de milho e sua função ainda é muito discutida. Neste sentido, Sachan e Nath (1994) analisaram a elasticidade e resistência de espigas em sete raças de milho relacionando com diferentes números de knobs. Os resultados indicaram que espigas macias e flexíveis estavam associadas com um baixo número de knobs, refletindo um baixo nível de introgressão de teosinto.

O efeito citoplasmático no pareamento cromossômico em híbridos de milho com teosinto foi estudado por Ramesha e Sachan (1993). Os genótipos

Zea diploperennis, *Z. luxurians*, *Z. mays* subsp. *Parviglumis* e algumas raças primitivas de milho foram hibridizadas com milho moderno cultivado. Todos os híbridos envolvendo *Z. diploperennis* mostraram redução marcante na frequência de quiasmas com um aumento de bivalentes em bastão e univalentes. A frequência de bivalentes em anel decresceu quando o citoplasma era de *Zea diploperennis*. Híbridos envolvendo *Zea luxurians* mostraram redução também na frequência de quiasmas e um aumento de univalentes. Nenhum efeito foi encontrado nos cruzamentos envolvendo *Zea mays* subsp. *parviglumis*. Foi concluído que a divergência citoplasmática é maior entre milho e *Zea diploperennis*, seguido de *Zea luxurians* e *Zea mays* subsp. *parviglumis*.

Genótipos que possuem o núcleo de milho com o citoplasma de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) foram analisados no estágio de células mães de pólen-CMP (Poggio *et al.*, 1994). Os resultados apoiam a hipótese que cada grupo de 5 bivalentes correspondem a diferentes genomas, indicando uma origem alotetraplóide para milho. A viabilidade de grãos de pólen foi de 0 – 48 % nestas linhas aloplásmicas.

Poggio *et al.* (1997a) analisou o comportamento meiótico e conteúdo de DNA em linhas aloplásmicas de milho. Foi evidenciado que o citoplasma de *Zea mays* subsp. *mexicana* afeta vários caracteres herdáveis quando combinado com os genótipos de milho. Os resultados obtidos sugerem que o citoplasma de teosinto promove um aumento do conteúdo nuclear de DNA, talvez pelo aumento de DNA altamente repetitivo nas zonas de knobs. A análise do comportamento meiótico indica que o citoplasma de teosinto pode alterar a distribuição espacial dos genomas, uma vez que dois grupos de cinco

bivalentes foi observado em alta frequência. Durante a Prófase I – Anáfase I, cada grupo de cinco bivalentes comportam-se de forma assincrônica e, além disto, dois nucléolos foram observados em 10 % das células. Estes resultados sugerem que o citoplasma de teosinto poderia induzir mudanças afetando a estrutura e função genômica em alguns genótipos de milho. Estas mudanças são de potencial importância para programas de melhoramento e estudos evolutivos.

No mesmo ano, Poggio *et al.* (1997b) construíram linhas aloplásmicas MDE (linhas com citoplasma de teosinto) utilizando linhas múltiplas dominantes MDZ (linhas com citoplasma de milho) como um pai masculino recorrente durante 20 gerações de retrocruzamentos com teosinto (*Zea mays ssp.mexicana* – *Zea mexicana*). A meiose revelou que plantas MDZ possuíam meiose regular enquanto plantas MDE mostravam comportamento meiótico irregular em diferentes partes da panícula, incluindo citomixia, fusão de núcleos, pseudomultivalente, asinapsia ou um nucléolo persistente na metáfase. Segundo os autores, a discutível explicação para as anormalidades nas linhas MDE é que eram devidas a ação de transposons transportados por MDZ os quais tornaram-se ativados no citoplasma de teosinto.

Williams *et al.* (1995) compararam as distâncias de recombinação em linhagens de milho, cruzamentos amplos e em híbridos interespecíficos. A recombinação em milho e teosinto foi estudada usando o cromossomo 1L (Chr 1L). Todos os cruzamentos entre os genótipos exóticos X Chr1L mostraram um aumento na recombinação em relação ao domesticado X Chr1L. A variabilidade na taxa de recombinação não foi relacionada a distância genética entre os pais. Em quatro cruzamentos teosinto X milho, entretanto, não foi

observada qualquer recombinação.

Desta maneira, diferentes pesquisadores avaliaram genótipos de milho, de teosinto e de híbridos entre estas espécies no sentido de obter maiores informações quanto ao comportamento citológico. O melhor entendimento da conexão evolutiva de milho com teosinto e da seleção de genótipos mais estáveis a nível citológico abre maiores possibilidades de utilização deste germoplasma relacionado em hibridizações com o milho cultivado.

O presente trabalho teve como objetivos estimar a variabilidade genética em genótipos de milho doce, milho comum e teosinto através de marcadores moleculares e analisar a nível citogenético populações de milho e teosinto. Também avaliar a estabilidade citológica em híbridos entre milho e teosinto.

2. Variabilidade genética em populações de milho e teosinto estimada através de microssatélites (SSR)

2.1 Introdução

A origem do milho tem sido analisada por diversos autores e nos últimos anos, inúmeras evidências têm indicado a hipótese de que o milho foi domesticado a partir do teosinto (Galinat, 1973). Estudos genéticos e moleculares têm mostrado que o teosinto anual (*Zea mays* subsp. *mexicana* e *Zea mays* subsp. *parviglumis*) tem maior relacionamento com o milho, em comparação às outras espécies e subespécies de teosinto, sugerindo que estas duas espécies são os prováveis progenitores do milho (Doelbley *et al.*, 1990). Milho e teosinto tem o mesmo número básico de cromossomo ($2n=20$), apresentando padrões comuns em nível citogenético (Lübberstent, 1998).

No melhoramento de plantas, a variabilidade genética é o principal fator para obtenção de sucesso. Com o estreitamento da variabilidade genética, devido aos intensos ciclos de seleção, muitos alelos de genes importantes que não são selecionados tendem a ser eliminados dos materiais elite, como resistência a pragas e moléstias, estresse ambiental e adaptabilidade. As espécies afins ou silvestres são uma potencial fonte de variabilidade genética,

podendo ser exploradas por programas de melhoramento. Cruzamentos entre teosinto e milho ocorrem livremente, podendo este servir como fonte genética de caracteres agronômicos para introdução no milho. Lübberstent (1998) estudando características agronômicas em teosinto, constatou que este continha variabilidade para resistência a pragas e doenças e até genes para aumento do rendimento de grãos. A variabilidade genética pode ser estimada através de várias técnicas como marcadores morfológicos, bioquímicos ou moleculares. Os marcadores moleculares estimam a variabilidade sem a influência do ambiente. Vários trabalhos têm sido realizados utilizando marcadores moleculares em milho. Lübberstent *et al.* (1998) estudou a variação de SSR em milho, podendo estes microssatélites serem aplicados nas espécies de teosinto tendo em vista o interesse de obter genes para o milho. Também, Gethi *et al.*, (2002) analisaram a diversidade genética entre e dentro de linhagens de milho de diferentes origens usando marcadores moleculares microssatélites.

O objetivo do presente trabalho foi estimar a variabilidade genética entre e dentro de populações de milho e teosinto através de marcadores moleculares, utilizando *primers* de microssatélites associados com genes envolvidos em rotas bioquímicas de metabolismos básicos fisiológicos.

2.2 Materiais e Métodos

Foram analisadas duas populações de milho doce (BR400 e BR402), duas de milho comum (Suwan e Pampa) e uma população de teosinto. As populações foram provenientes da Embrapa, dos Centros de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG e do Centro de Pesquisa Agropecuário de

Clima Temperado, Pelotas - RS. Cada população foi representada por 20 plantas que foram semeadas em vermiculita e no estágio de três folhas foi extraído o DNA. Esta extração foi feita pelo método CTAB (Saghai-Marrof *et al.*, 1984) e a quantificação feita por espectrofotômetro (GENESYS™ 2).

Foram utilizados dez pares de *primers* de microssatélites (Tabela 1), selecionados a partir do banco de dados do milho (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>). As reações de microssatélites foram preparadas para um volume de 25 µl. Contendo 60 ng de DNA genômico; Tampão 10X (Gibco BRL); 1,5 mM de MgCl₂ (Gibco BRL); 0,2 mM de dNTP (Gibco BRL); 1U de Taq-DNA Polimerase (Gibco BRL); 30 pmol de cada *primer*. As amplificações foram realizadas em termociclador (modelo: PTC-100, MJ Research, Inc.).

O programa utilizado para a amplificação do DNA genômico foi do tipo *Touchdown* que consistiu de 18 ciclos de 94°C por 1 minuto seguido de um decréscimo de 1°C a cada 2 ciclos (64°C a 55°C) e 72°C por 1 minuto. Somaram-se a isso 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C também por 1 minuto. O marcador DNA ladder - 100pb (Gibco BRL) foi utilizado como padrão de peso molecular, para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose comum na concentração de 3,2%, revelados em brometo de etídio e as imagens foram capturadas utilizando o programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

Foram analisados o número de alelos por loco, frequência dos alelos nas populações, conteúdo de polimorfismo (PIC), obtido através da expressão: $PIC = 1 - \sum p_u^2$, onde p_u^2 é a frequência do alelo u elevado a segunda potência. A

diversidade genética dentro de cada população foi calculada utilizando dados binários baseada no coeficiente de Jaccard, obtido pela expressão: $d = 1 - (a / (n-d))$, onde a é o número de coincidência positivas, n o tamanho da amostra e d o número de coincidência negativa (Dias, 1998).

A distância genética entre as populações de milho e teosinto foi estimada pelo coeficiente de NEI72, obtido pela expressão: $D = -\ln(I)$, onde \ln é o logaritmo neperiano e (I) é a medida de identidade genética, calculada pela expressão $I = \frac{J_{PQ}}{\sqrt{(J_P \times J_Q)}}$, onde $J_P = \sum p_i^2$, $J_Q = \sum q_i^2$ e $J_{PQ} = \sum p_i q_i$, considerando p_i e

q_i as frequências do alelo i nas populações P e Q . A matriz de distância genética de NEI72 foi utilizada para gerar o dendograma através do procedimento SAHN do aplicativo NTSYS (Rohlf, 2000) A análise de variância molecular foi gerada utilizando o software Arlequin 2.01 (Shneider *et al.*, 2000). Este procedimento de análise de variância das frequências gênicas utilizou o tamanho de cada haplotipo, em pares de bases.

2.3 Resultados e Discussão

Foram detectados 33 alelos nos dez locos analisados, apresentando um número médio de alelos por loco variando de dois no loco phi032 a seis no loco phi021 (Tabela 1). Os tamanhos alélicos encontrados variaram entre 40 a 244 pb (Tabela 1). Para os locos phi029 e phi032 os resultados foram semelhantes aos encontrados por Matsuoka *et al.* (2002) na avaliação de variabilidade genética no gênero *Zea* e Senior *et al.* (1998) analisando a similaridade genética em milho, encontrou alelos com mesmo tamanho, em pares bases, para o *primer* nc004. Também, Pejic *et al.* (1998) analisando similaridade entre

linhas de milho, encontrou 183 alelos em 27 locos de microssatélites, com uma média 4,4 alelos por loco. Este elevado número de alelos por locos é provavelmente devido aos *primers* utilizados apresentarem maior variação nas linhagens analisadas

O grau de polimorfismo (PIC), que fornece uma estimativa do poder discriminatório de um marcador, variou de 0,26 no *primer* phi032 a 0,76 no *primer* phi021, associados a síntese de sacarose¹ e a ferredoxina³, respectivamente. O PIC médio foi similar ao encontrado por Weir (1996), e também semelhante ao encontrado por Amorim (2002) na análise de diversidade genética em milho doce. Neste trabalho foram utilizados 14 diferentes genótipos, aumentando assim o poder discriminatório de cada *primer*. Também, Matsuoka *et al.* (2002) na análise de SSR em linhagens de milho e na análise conjunta de teosinto e milho encontrou um PIC médio de 0,62 (variando de 0,18 a 0,89) e 0,73 (variando de 0,22 a 0,91), respectivamente. O PIC é o grau de polimorfismo detectado a partir de um determinado par de *primer*, que esta diretamente relacionando com a variabilidade da região nos genótipos estudados. Matsuoka *et al.* (2002) analisando a variabilidade dos *primers* phi029 e phi032 encontrou um PIC de 0,73 para ambos, onde foram analisadas sessenta populações de polinização aberta de teosinto e milho e 101 linhagens, representando as três maiores fontes de germoplasma de milho do mundo. O aumento do número de genótipos analisados possibilita detectar valores superiores de PIC. No presente trabalho o *primer* phi021, nas cinco populações analisadas, apresentou o maior PIC (0,76), sendo este, considerado elevado.

Tabela 1- Primers de microssatélites, número e tamanhos dos alelos por locus e grau de polimorfismos (PIC). Faculdade de Agronomia - UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Primer	Cromossomo	Nome completo do gene	Número de alelos	Tamanho alélico (pb)	PIC
umc106 4	1	Ferrodoxina 3	3	140-165	0,64
umc118 5	2	Oleosina 1	3	115-140	0,48
umc162 2	2	Regulador da citocinina	3	40-90	0,32
phi029	3	Triose fosfato isomerase 4	3	144-165	0,55
phi021	4	Álcool desidrogenase2	6	85-114	0,76
nc004	4	Álcool desidrogenase2	4	150-180	0,68
nc012	6	Piruvato, ortofosfato diquinase	3	110-130	0,39
umc154 5	7	Proteína de choque de calor3	3	48-80	0,43
umc120 2	8	Proteína 1 inativadora do ribosomo	3	140-161	0,45
phi032	9	Síntese de sacarose1	2	215-244	0,26
Média			3,3		0,50

A variabilidade genética dentro de cada população variou de 0,22 na população Suwan e de 0,40 na população teosinto (Tabela 2). Matsuoka *et al* (2002), analisando a variabilidade de microssatélites no gênero *Zea*, mostraram que o teosinto (*Zea mays ssp. mexicana*) apresentou uma diversidade genética de 0,67. Porém, neste trabalho foram utilizados 44 *primers* de SSR, além disso, foram estudados seis diferentes acessos de teosinto e no presente trabalho foram utilizados dez *primers* e um acesso de teosinto. O número de populações proporcionaria maior detecção da variabilidade genética.

Em relação às populações de milho doce e milho comum, nenhum estudo de variabilidade em nível molecular foi encontrado. A população Suwan teve a menor variabilidade para os genes analisados, isso pode ser devido ao baixo número de indivíduos utilizados para manter esta população no banco de

germoplasma da UFRGS. As outras populações de milho são recém adquiridas e ainda mantêm toda a sua variabilidade. Da mesma forma que a população de teosinto, é uma população silvestre, com ausência da seleção artificial, conservando toda a sua variação.

A variabilidade média das populações, comparada com outros estudos foi inferior à encontrada por Amorim (2002), Senior *et al.*, (1998) e Matsuoka *et al.*, (2002). No presente trabalho já era esperado uma baixa variabilidade, pelo fato de serem utilizadas regiões de pouca variação dentro do genoma de cada população. Estas regiões foram selecionadas por participar de processos fisiológicos básicos da produção de energia na ausência de oxigênio, associando-as com possibilidade de tolerância ao encharcamento nestas populações.

Tabela 2 – Distribuição dos alelos e diversidade genética dentro das populações Suwan, Pampa, BR400, BR402 e Teosinto, utilizando 10 *primers* de microssatélites. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Populações	Marcadores polimórficos	Total de alelos	N. médio de Alelos / loco polimórfico	Diversidade Genética
Suwan	50%	11	2,20	0,22
Pampa	80%	18	2,25	0,32
BR400	50%	14	2,80	0,33
BR402	70%	17	2,43	0,31
Teosinto	80%	20	2,50	0,40
Média	66%		2,44	0,31

O baixo nível de oxigênio em áreas potencialmente agricultáveis reduz a produtividade de grãos da cultura do milho. A maioria destas áreas possuem alto índice de fertilidade e são submetidas a períodos de encharcamento do solo por inundação pluvial ou irrigação inadequada. O desenvolvimento de cultivares tolerantes ao encharcamento é uma alternativa para exploração

destas áreas e um dos mecanismos envolvidos na tolerância ao encharcamento é a capacidade de produzir energia com pouco oxigênio (Vitorino *et al.*, 2001). Os *primers* selecionados, no presente trabalho, estão associados com genes de diversos processos fisiológicos do metabolismo da planta. Desta forma, a variabilidade destes genes em germoplasmas possibilita selecionar alelos com potencial tolerância ao encharcamento.

Dos dez locos polimorficos, a análise de variância molecular (amova) detectou que 56% da variação alélica foi observada entre as populações e que apenas 11,5% da variação situa-se entre os indivíduos dentro de cada populações (Tabela 3). Estes valores indicam que é possível fazer seleção dentro de cada população, porém, o fato da variação entre as populações ser superior, sugere que cruzamentos entre as populações poderão ter maior progresso genético, pelo fato destas terem freqüências alélicas distintos. A variação dentro dos indivíduos, que expressa a heterozigose média dos indivíduos nas populações foi de 32,82%.

Gethi *et al.* (2002) analisando a variação de SSR em linhagens de milho constatou que 87,5% da variação alélica estava entre as linhagens, 4,6% dentro dos indivíduos e 7,6 entre indivíduos dentro das linhagens. A variância entre as linhagens encontradas pelos autores acima foi superior a encontrada no presente trabalho. Isso provavelmente ocorreu devido ao fato dos autores utilizarem linhagens, o que diminui a heterozigosidade e a variação entre indivíduos devido a autofecundação, conseqüentemente a variação tende a ser entre as linhagens.

Tabela 3 – Análise de Variância Molecular (Amova) das freqüências alélicas de 10 genes em cinco populações (Suwan, BR400, BR402, Pampa e Teosinto). Faculdade de Agronomia/UFRGS, 2002.

Causa de Variação	GL	SQ	Componentes de Variância	Percentagem de Variação (%)
Entre Populações	4	19,456	0,12423	55,62
Entre Indivíduos dentro de populações	91	11,31	0,02568	11,56
Dentro de indivíduos	96	7	0,07292	32,82
Total	191	37,766	0,22214	100

Quando feita a análise de variância molecular envolvendo apenas as populações de milho, foi detectado uma variação entre as populações de 75% e apenas 6% entre os indivíduos dentro de populações. Este resultados confirmam a alta variabilidade entre os indivíduos dentro da população de teosinto, indicando este como potencial de fonte de variabilidade a ser explorada no melhoramento de milho.

A distância genética obtida pelo coeficiente de NEI72, que expressa as diferenças nas frequências alélicas ocorridas durante o tempo de diferenciação das populações, mostrou que o teosinto se agrupou separadamente das outras populações (Figura 1), utilizando a distancia genética média. Estes resultados confirmam a semelhança genômica do milho com teosinto, e que as populações de milho tiveram pouca variação nas frequências alélicas.

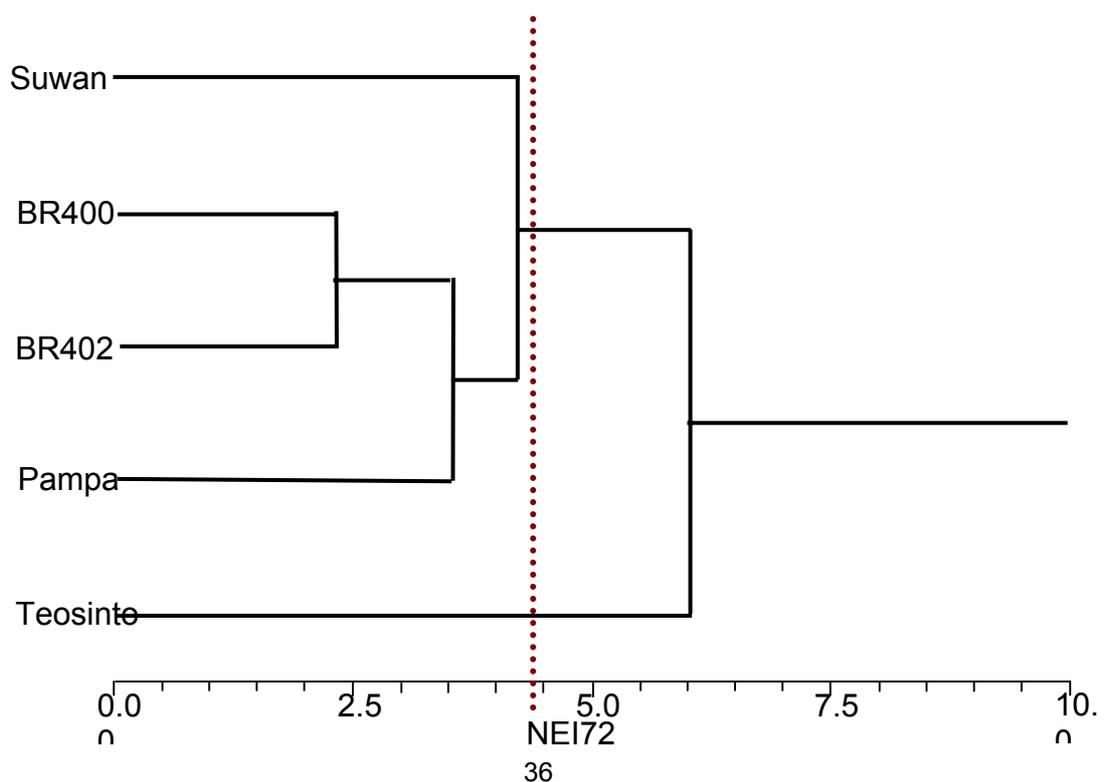


Figura 1 –Agrupamento obtido da matriz de distância genética, baseado no coeficiente de NEI72. Considerando 10 *primers* de microssatélites. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Segundo Dias (1998) o valor de NEI72 é proporcional ao tempo decorrido da divergência e à taxa de substituição gênica por loco e por geração, assumindo taxa constante com o tempo. No presente trabalho, a distância genética encontrada entre milho e teosinto foi de 6.0. Desta forma, significa que entre a espécie de teosinto e a espécie de milho, em média, 600 substituições alélicas foram detectadas em microssatélites para cada 100 locos, desde o período de divergência das populações comparadas a partir de uma população ancestral comum.

2.4 Conclusão

Os microssatélites analisados detectaram variabilidade nas populações, sendo que a maior parte da variabilidade genética encontra-se distribuída entre as populações

O teosinto, apresentou maior variabilidade genética, quando comparado com as populações de milho doce e milho comum.

3. Análise citogenética em populações de milho, teosinto e em seus híbridos

3.1 Introdução

A evolução do milho tem sido intensamente estudada em relação a outras plantas cultivadas. Entretanto, sua origem ainda não foi totalmente esclarecida. Esta cultura apresenta $2n=20$ cromossomos, sendo o milho considerado um poliplóide críptico com ancestral apresentando número básico de cromossomos $x=5$ (Poggio *et al.*, 2000).

O gênero *Zea* é composto de duas seções: a seção luxurians (Doebley & Iltis) que inclui os teosintos perenes *Z. diploperennis* (Iltis) e *Z. perennis* (Hitda) e o teosinto anual *Z. luxurians*. A seção *Zea* contém as espécies anuais de *Zea mays*, divididas em várias subespécies, incluindo as espécies *Z. mays* subsp. *mays* (milho) e *Z. mays* subsp. *mexicana* (teosinto). Todas as espécies deste gênero apresentam $2n=20$, exceto para *Z. perennis*, com $2n=40$ cromossomos (Poggio *et al.*, 2000).

A análise citogenética para estudos de regularidade meiótica pode ser usada em programas de melhoramento envolvendo milho e espécies relacionadas que possam contribuir com genes de interesse. A citogenética é a

ciência que estuda todo e qualquer comportamento relativo a cromossomos isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação; bem como na sua variação e evolução durante a transmissão generativa (meiose) e somática (mitose) (Guerra, 1988). A análise citogenética é importante em qualquer programa de melhoramento, pois através destes estudos é possível determinar o número e comportamento dos cromossomos, níveis de ploidia, fertilidade dos grãos de pólen, formação do complexo sinaptonêmico, quiasmas e formação dos gametas haplóides, auxiliando na identificação e escolha de materiais para serem utilizados em cruzamentos dirigidos (Hanna, 1980; Sybenga, 1993, 1998). Além disso, através da meiose é possível estudar o processo da recombinação e segregação que tem grande importância para variabilidade.

A recombinação é um processo de grande importância para programas de melhoramento, principalmente na recuperação de pai recorrente na transferência de genes de espécies silvestres. Segundo William *et al.* (1995) a recombinação ocorre durante o *crossing-over* na meiose I, visualizados pela presença dos quiasmas. Desta forma, a quantificação do número de quiasmas é um indicativo da taxa de recombinação entre genótipos.

A análise citogenética proporciona selecionar as melhores combinações entre diferentes genótipos, possibilitando maior estabilidade meiótica, diminuindo a quantidade de anomalias em gerações seguintes. Também é possível obter cruzamentos que apresentem maior capacidade de recombinação entre os cromossomos, aumentando a eficiência na quebra dos grupos de ligações.

O presente trabalho teve como objetivos analisar a estabilidade citológica em populações de milho, teosinto e em híbridos entre estas espécies e avaliar as melhores combinações entre os genótipos de milho e teosinto.

3.2 Materiais e Métodos

Para análise citológica foram realizados cruzamentos entre as populações de milho (BR-400, BR402 e DO1880) e teosinto. As populações foram provenientes da Embrapa, dos Centros de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG e do Centro de Pesquisa Agropecuário de Clima Temperado, Pelotas – RS. As populações de milho são variedades de polinização aberta e o teosinto constou de uma amostra comercial, proveniente de produtores da região de Pelotas-RS, identificado como *Zea mays* subsp. *mexicana*.

As populações de milho foram oriundas da EMBRAPA, dos Centros de Pesquisa de Milho e Sorgo , Sete Lagoas - MG e do Centro de Pesquisa Agropecuário de Clima Temperado, Pelotas – RS. Este último também forneceu a população de teosinto.

Os híbridos foram obtidos na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada em Porto Alegre – RS. Foram formados três híbridos entre milho e teosinto nos meses de novembro de 2001 a janeiro de 2002. O teosinto foi semeado em duas etapas com um intervalo de sete dias da primeira para a segunda semeadura. O milho foi semeado em três etapas, sendo que a primeira semeadura coincidiu com a segunda do teosinto. As semeaduras seguintes foram realizadas com o intervalo de sete dias para possibilitar a hibridização, uma vez que o teosinto possui uma grande

variabilidade na emissão do florescimento, além de possuir ciclo mais tardio quando comparado ao milho cultivado.

Os blocos de cruzamento continham, para cada população, seis linhas de cinco metros com espaçamento de 0,5m entre linhas e 0,3m entre plantas. As hibridizações foram realizadas utilizando teosinto como genitor masculino e o milho como feminino. O controle dos cruzamentos foi feito manualmente, com proteção das espigas antes da emissão dos estigmas, utilizando sacos plásticos, evitando a polinização com pólen estranho. O pólen a ser utilizado nos cruzamentos foi proveniente da mistura de pólen de todas as plantas de cada população. Após o cruzamento, as espigas foram protegidas com sacos de papel, permitindo a confiabilidade de cada híbrido.

Nos meses de julho e agosto de 2002, os híbridos foram semeados na Estação Experimental da Universidade Federal de Alagoas, localizada no Campus A.C. Simões em Maceió – AL. No período de setembro a outubro de 2003 foram coletados pendões para análise citogenética e realizados cruzamentos para formar gerações segregantes F₂ e a primeira geração de retrocruzamento RC₁F₁ para estudos posteriores.

No florescimento foram coletados pendões em diversas fases de desenvolvimento da microsporogênese. As populações BR400, BR402, DO1880 e teosinto foram coletadas na Faculdade de Agronomia – Porto Alegre/RS no período de janeiro a fevereiro de 2002, enquanto os híbridos foram coletados no período de setembro a outubro de 2002 na Estação Experimental da Universidade Federal de Alagoas – Maceió/AL. Após a coleta dos pendões, estes foram colocados em vidros contendo fixador Carnoy (3 álcool etílico 99,8% : 1 ácido acético glacial) e mantidos por 24h em

temperatura ambiente. Após 24 horas foram transferidos para álcool 70% e conservados em temperatura de -20°C .

As análises foram feitas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Plantas de Lavoura, localizado na Faculdade de Agronomia –UFRGS/RS. As lâminas foram confeccionadas pelo método de esmagamento (Lewis e John, 1964), coradas com carmim propiônico 0,6 %. As anteras foram retiradas com auxílio de uma lupa e agulha histológica e com o auxílio de um conta-gotas foi colocado o corante carmim propiônico sobre as anteras. O esmagamento foi feito com uma lanceta, sendo retirado os fragmentos maiores das anteras, mantendo apenas o corante e os meiócitos. Estes foram cobertos com uma lamínula nova e suavemente aquecidos para aumentar a capacidade de coloração do corante. Para observar as fases da meiose, lâmina e lamínula foram fortemente pressionadas para espalhamento dos cromossomos. Na análise de tétrades, grãos de pólen imaturo e maduro não foi realizado este procedimento, pois o esmagamento danificaria as células.

Após a confecção, as lâminas foram vedadas com luto (breu e cera de abelha na proporção 1:1), identificada e posteriormente observada ao microscópio ótico acoplado em microcomputador com câmera de captura de imagem digital. As imagens foram capturadas utilizando o software SDI (Sistema de Diagnóstico por Imagem). Para identificação da meiose e grãos de pólen imaturo a avaliação foi realizada no dia seguinte ou no máximo uma semana após o preparo da lâmina.

Foram analisadas as fases de diacinese e metáfase I, para análise de pareamento cromossômico. Na fase de diacinese foi analisado o pareamento entre os cromossomos de milho e teosinto e o número de crossing-over em

cada célula. O pareamento cromossômico foi registrado com a ocorrência de univalentes (I) e bivalentes (II) e hipótese de igualdade testada pela estatística do χ^2 (qui-quadrado). O número de quiasmas foi analisado em análise de variância (ANOVA).

Como complemento à análise de meiose, Love (1949) sugeriu a utilização de índice meiótico, que representa a percentagem de quartetos de pólen normais, como indicador de regularidade meiótica. Foram divididos o número de tétrades normais pelo total de tétrades analisadas vezes 100. Foram consideradas tétrades normais aquelas que apresentavam quatro micrósporos de tamanhos iguais e anormais aquelas com número de células diferentes de quatro e que apresentassem anomalias como fragmentos cromossômicos (micronúcleos) e ausência de núcleo. O registro foi feito em 100 células por indivíduo, distribuídas aleatoriamente em cada lâmina.

A viabilidade de pólen foi estimada de acordo com a capacidade de coloração dos grãos com carmim propiônico, analisando pólen imaturo e maduro. Foram analisados 100 grãos de pólen por planta, sendo considerados viáveis os grãos que se apresentaram corados e inviáveis os grãos de pólen vazios ou incolores. A viabilidade foi calculada dividindo o número de grãos corados pelo total de pólen analisados, multiplicando por 100.

3.3 Resultados e Discussão

O comportamento cromossômico foi realizado em diacinese e metáfase I pela maior facilidade de visualização dos cromossomos e das associações que estes apresentavam. Para os genótipos de milho e teosinto foram observados apenas associações de bivalentes em diacinese e metáfase I (Tabela 1 e 2),

apresentando 10 bivalentes (Figura 1A e 1B). Estes resultados são os mesmo encontrados por Chang e Newffer (1988) na análise detalhada da microsporogênese de milho e por Poggio *et al* (2000).

Em alguns híbridos entre milho e teosinto foram encontrados frequências de univalentes (I) e bivalentes (II) (Figura 2C e 2D) em diacinese e metáfase I, (Tabela 1 e 2).

Defani-Scoarize *et al.* (1996) analisando a meiose de linhas de milho observaram a presença de univalentes. Segundo os autores, em várias espécies todos os eventos ocorridos na meiose estão sob controle genético, sendo que em milho mais de vinte genes afetando a meiose têm sido encontrados. Esses genes estão suscetíveis a mutação, que podem influenciar desde a pré-meiose até a formação dos grãos de pólen e que a presença de cromossomos univalentes em linhagens é devido a segregação dos genes. No presente trabalho não houve identificação de univalentes nas populações de milho e teosinto, pois eram de polinização aberta. Entretanto os híbridos entre milho e teosinto tiveram presença de univalentes, que pode ser atribuída a ausência de homologia entre os genomas do milho e teosinto.

Tabela 1 – Comportamento cromossômico em diacinese em genótipos de milho, teosinto e em seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Genótipos	Plantas analisadas	Células analisadas	Diacinese		χ^2
			2(I)	9(II) ¹	
Teosinto	5	81	0	81	0,00
BR400	3	64	0	64	0,00
BR402	1	25	0	25	0,00
DO1880	1	14	0	14	0,00
BR400-Teosinto	4	97	20	77	4,12*
BR402-Teosinto	5	95	24	71	6,06*
DO1880-Teosinto	2	42	6	36	0,86
Híbrido	11	234	50	184	10,68*
Milho	5	103	0	103	0,00

¹ células com dois univalentes e nove bivalentes

² células normais com 10 bivalentes

* significativo a 5% pelo teste do qui-quadrado

Tabela 2 – Comportamento cromossômico em metáfase I em genótipos de milho, teosinto e em seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Genótipos	Plantas analisadas	Células analisadas	Metáfase			χ^2
			2(I) 9(II) ¹	10(II) ²	6(I) 7(II) ³	
Teosinto	7	59	0	59	0	0,00
BR400	3	25	0	25	0	0,00
BR402	1	40	0	40	0	0,00
DO1880	1	18	0	18	0	0,00
BR400-Teosinto	1	14	4	10	0	1,14
BR402-Teosinto	3	56	15	41	0	4,02*
DO1880-Teosinto	1	30	7	22	1	2,13
Híbrido	5	100	26	73	1	7,29*
Milho	5	83	0	83	0	0,00

¹ células com dois univalentes e nove bivalentes

² células normais com 10 bivalentes

³ células com seis univalentes e sete bivalentes

* significativo a 5% pelo teste do qui-quadrado

As freqüências de univalentes em híbridos entre milho e teosinto implicam em dificuldades no processo de transferência de genes do teosinto para o milho, por interferir diretamente no processo de recombinação e na perda ou ganho de cromossomos na geração seguinte. Segundo Defani-Scoarize *et al.* (1996) a disjunção de univalentes ocasiona a formação de micronúcleo ou núcleo aneuplóide durante a telófase I. Além disso, ocasiona alto aborto de pólen e óvulo, reduzindo a produtividade.

A análise individual do pareamento em diacinese e metáfase I nos genótipos mostrou que o cruzamento envolvendo a população DO1880 e o teosinto teve menor freqüência de univalentes, quando comparado com os outros híbridos (Tabela 1 e 2). O híbrido BR400 x teosinto apresentou freqüência de univalentes não significativa em metáfase I (Tabela 2, Figura

2D). Porém, esta ausência de significância pode ser atribuída a reduzida sensibilidade do teste.

Segundo Golubouskaya (1989) o pareamento cromossômico esta sob controle de vários genes. Desta forma, diferentes combinações entre genótipos de milho e teosinto poderão proporcionar maior estabilidade citogenética. Os resultados encontrados apoiam a hipótese de similaridade entre os genomas do milho e teosinto, citadas por diversos autores (Doebley *et al.*, 1990); e (Szabo & Burr, 1996) e (Poggio *et al.*, 2000).

Outras anomalias foram observadas como aderência de cromossomos (Figura 2A), cromossomos fora da placa metafásica, cromossomos retardatários (Figura 1E) e pontes em anáfase I (Figura 2E). Também, foi observado um aumento de univalentes em metáfase I, sugerindo a existência de dessinápse durante a diacinese (Figura 2B).

Foi observado a presença de dois grupos de cinco bivalentes (Figura 1F), em células de metáfase I, concordando com Naranjo (1990) que registrou número cromossômico básico $X = 5$ para o gênero *Zea*.

O índice meiótico (Tabela 3) encontrado para o milho, teosinto e em seus híbridos foi superior a 98,5%, sendo este considerado uma alta normalidade de tétrade. Nesta análise foram considerados anormais células com díades, tríades, micronúcleo e ausência de núcleo (Figura 2F).

Tabela 3 – Índice meiótico e viabilidade de pólen em genótipos de milho, teosinto e seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Genótipos	Tétrade			Pólen		
	Plantas analisadas	Células analisadas	Índice meiótico (%)	Plantas analisadas	Células analisadas	Viabilidade e de pólen (%)
Teosinto	3	300	100	4	400	100

BR400	1	100	100	3	300	99,3
DO1880	2	200	98,5	4	400	100
BR402	1	100	100	-	-	-
BR400- Teosinto	4	400	99,5	-	-	-
BR402- Teosinto	4	400	100	4	400	98,8
DO1880- Teosinto	2	200	100	1	100	99,8
Híbrido	10	1000	99,8	5	500	99,3
Milho	4	400	99,5	7	700	99,7

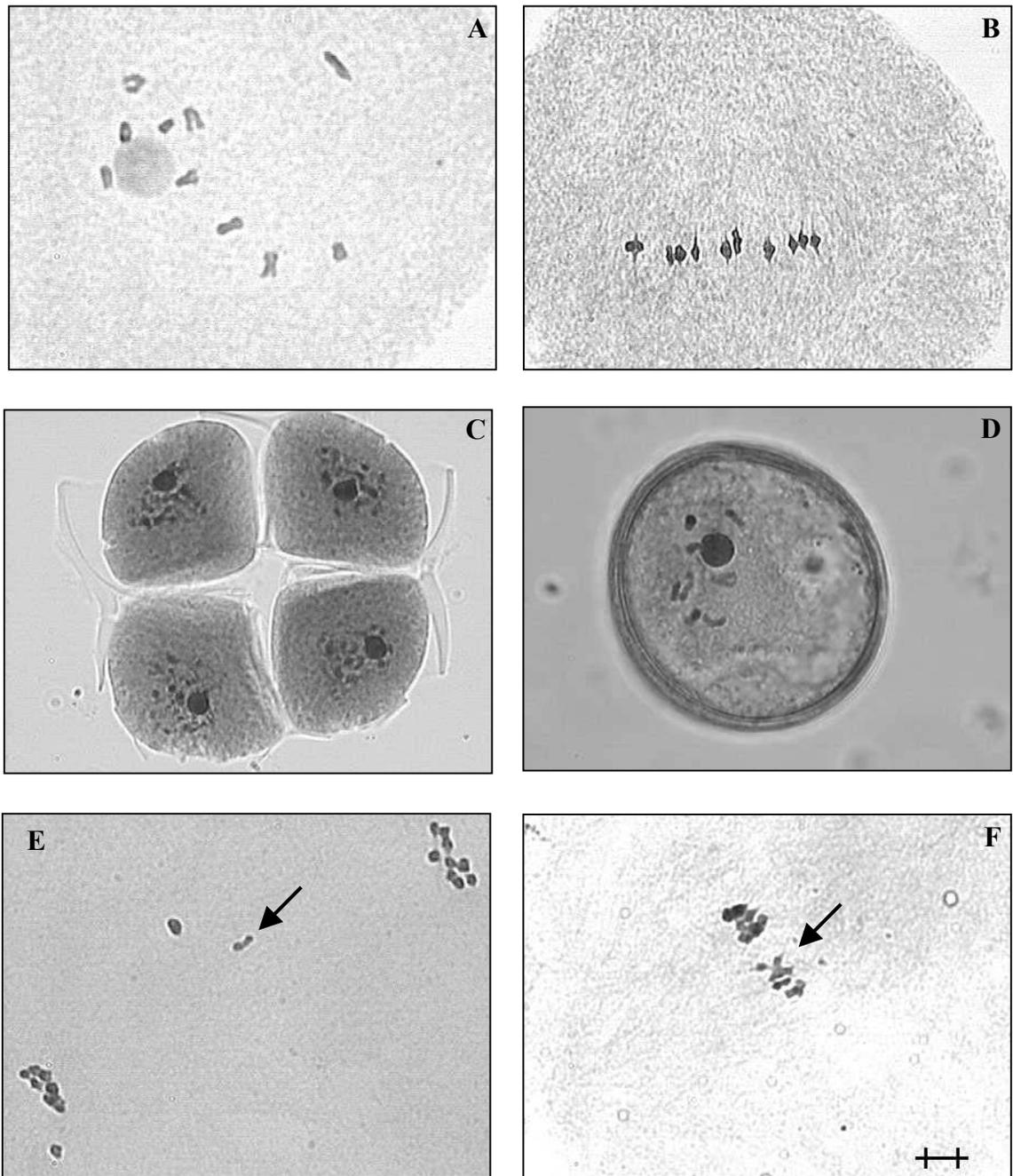


Figura 1 – Comportamento meiótico em milho, teosinto e em seus híbridos. Diacinese (A), metáfase I (B), tétrade (C), pólen imaturo (D). cromossomos retardatários (E) e dois grupos de cinco bivalentes (F). Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002. (10 μ m).

Esta análise é considerada uma sub estimativa do comportamento meiótico. O mesmo comportamento ocorreu na viabilidade de grãos de pólen (Tabela 3), onde foi observado uma variação de 98,8% a 100%.

Uma análise comparativa entre as fases da meiose (Tabela 4) evidenciou um aumento do número de células contendo univalentes em metáfase I, comparadas com a diacinese. Este aumento é provavelmente devido a ocorrência de dessinápse (separação precoce dos cromossomos homólogos) ocasionando o aumento de univalentes na metáfase I (Figura 2B). Também, foi possível verificar que em tétrade e grãos de pólen não ocorreu uma expressão das anomalias registradas nas fases anteriores. Isto pode ter ocorrido devido a dois fatores: uma seleção meiótica das anomalias antes da fase de tétrade ou que as anomalias estão contidas nas tétrades e grãos de pólen e que estas serão apenas detectadas na geração seguinte.

Tabela 4 – Estabilidade citogenética em genótipos de milho, teosinto e seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Genótipos	Diacinese	Metáfase I	Tétrade	Pólen
Teosinto	98,8%	100%	100%	100%
Híbridos	78,6%	73%	99,8%	99,3%
Milho	100%	100%	99,5%	99,7%

O número de quiasmas foi significativo entre milho, teosinto e em seus híbridos, mostrando que a média de quiasmas do milho e teosinto foram significativamente superior a dos híbridos (Tabela 5). O mesmo comportamento foi obtido na análise entre os genótipos (Tabela 5), constatando que a população DO1880 não diferiu dos três híbridos interespecíficos, da mesma maneira que o híbrido DO1880 x teosinto não foi diferente estatisticamente das populações BR400 e BR402.

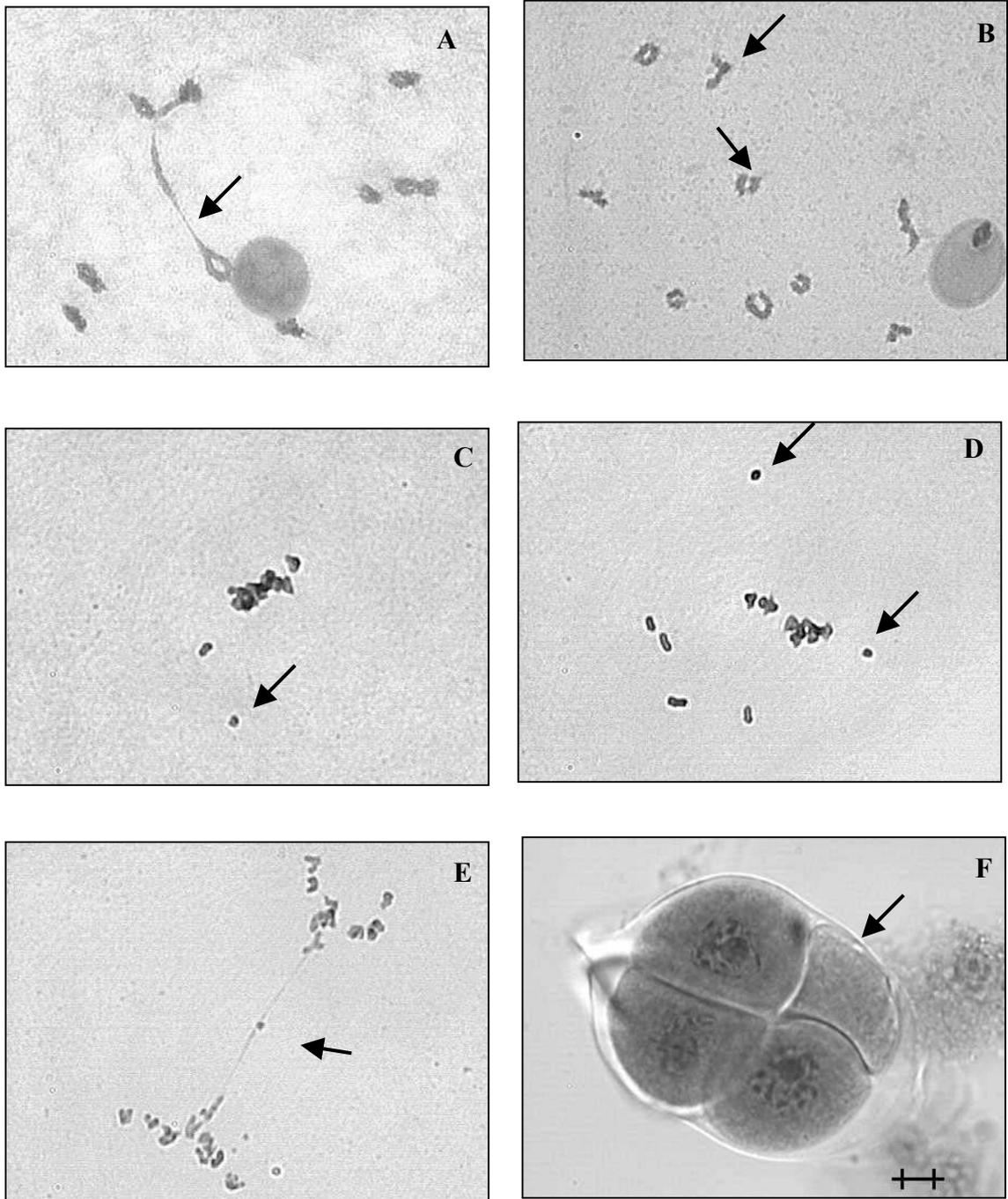


Figura 2– Anomalias em híbrido entre milho e teosinto. Aderência de cromossomos(A), dessinapse (B), univalentes (C e D), ponte em anáfase I (E) e tétrade com ausência de núcleo (F). Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002. (10 μ m).

Estudos em diferentes espécies têm demonstrado que a freqüência de quiasmas é controlada por mais de um gene, podendo ocorrer diferentes distribuições em populações distintas (Defani-Scoarize *et al.*, 1996). Também, mostrou que a freqüência de quiasmas em linhas endogâmicas de milho estão sob controle genético, apresentando variações entre as linhagens. Wilians *et al.* (1995) analisando variabilidade e distâncias de recombinação em milho e teosinto, mostrou que cruzamentos entre milho e teosinto apresentaram uma boa recombinação, similar aos cruzamentos entre as raças de milho.

Tabela 5 – Número médio de crossing-over em diferentes genótipos de milho, teosinto e em seus híbridos. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

Genótipos	Células analisadas	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Média
Teosinto	80	13	23	1,63	19,93 a
BR400	64	17	21	0,95	19,57 a c
BR402	26	17	21	1,06	19,42 a c
DO1880	14	16	23	2,46	18,35 a b
BR400-Teosinto	97	13	23	1,94	17,73 b
BR402-Teosinto	96	10	24	2,28	17,87 b
DO1880-Teosinto	41	15	25	1,98	18,73 b c
Teosinto	80	13	23	1,63	19,93 A
Milho	104	13	23	1,33	17,87 A
Híbridos	234	10	25	2,12	18,73 B

* médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de tukey a 5%
 Letras maiúsculas compara as fontes (milho, teosinto e híbridos)
 Letras minúsculas compara os genótipos individuais

No presente trabalho, os resultados indicaram que o genótipo DO1880 apresentou maior similaridade com o teosinto, tanto no pareamento cromossômico quanto no número de quiasmas. Na utilização do teosinto como fonte genética a ser introduzida no milho, é fundamental uma alta freqüência de recombinação. Desta forma a utilização do genótipo DO1880 proporcionaria uma maior recombinação e estabilidade meiótica nas gerações de retrocruzamentos entre milho e teosinto.

3.4 Conclusão

As populações de milho e teosinto apresentam uma meiose regular.

Os híbridos entre milho e teosinto apresentaram freqüência de univalentes, aderências de cromossomos, dessinápse em metáfase I e pontes em anáfase I.

A população de milho DO1880 tem maior similaridade genômica com o teosinto, proporcionando menor número de células com univalentes e maior número de quiasmas

Foi obtido um elevado índice meiótico e boa viabilidade de grãos de pólen.

4. Referências Bibliográficas

- ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 3^a ed. New York: John Wiley. 1960. 485p.
- AMORIM, E. P. **Variabilidade genética em milho doce estimada através de marcadores morfológicos, RAPD e microssatélites**. Porto Alegre, 2002. 69f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- ANDERSON, E.; CUTLER, H. C. Races of *Zea Mays* L. Their recognition and classification. **Ann. Mo. Bot. Gard**, Missouri, v.29, p.69-89, 1942.
- BROWN, W. L.; GOODMAN, M. M. Races of corn In: Corn and corn improvement. **American Society of Agronomy**, Madison, p.49-88, 1977.
- CAETANO-PEREIRA, C. M.; PAGLIARINI, M. S. Cytomixis in maize microsporocytes. **Cytological**, Tokyo, v.62, p.351-355, 1997.
- CHANG, M. T.; NEUFFER, M. G. Maize Microsporogenesis. **Genome**, Ottawa, v.32, p.232-244, 1989.
- DEFANI-SOARIZE, M. A.; PAGLIARINI, M. S.; GONÇALVES, C. Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). **The nucleus**, Calcutta, v.39, p.10-18, 1996.
- DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998, 574p.
- DOEBLEY, J. F.; STEC, A. Genetic Analysis of the Morphological Differences Between Maize and Teosinte. **Genetics**, Baltimore, v.129, p.285-295, 1991.
- DOEBLEY, J. F.; STEC, A.; WEDEL, J.; EDWARDS, M. Genetic and morphological analysis of maize-teosinte F2 population: Implications for the origin of maize. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.87, p.9888-9892, 1990.

- EDWARDS, J. W.; ALLEN, J. O.; COORS, J. G. Teosinte Cytoplasmic Genomes: 1 Performance of Maize Inbreds with Teosinte Cytoplasms. **Crop Science**, Madison, v.36, p.1088-1091, 1996.
- EUBANKS, M. W. 1999. Comparative analysis of the genomes of Zea and Tripsacum. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Missouri, v.73, p.30-32, 1999.
- GALLINAT, W. C. Intergenomic mapping of maize, teosinte and tripsacum. **Evolution**, Lawrence, v.27, p.644-655, 1973
- 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.
- GETHI, G. J.; LABATE, J. A.; LAMKEY, K. R.; SMITH, M. E.; KRESOVICH, S. SSR variation in important U.S. maize inbred lines. (Plant Genetic Resources). **Crop Science**, Madison, v.42, n.3, p.951-957, 2002.
- GEVERS, H. O.; LAKE, J. K. GLS1-a major gene for resistance to grey leaf spot in maize. **South African Journal of Science**. Petroria, v.90, n.7, p.377-379, 1994.
- GOLUBOVSKAYA, I. N. Meiosis in maize: mei genes and conception of genetic control of meiosis. **Adv Genet**, London, v.26, p.149, 1989.
- GOLUBOVSKYA, I. N. Genetic control of meiosis. **Internation Review Cytology**, New York, v.58, p.247, 1979.
- GOODMAN, M. M. Maize. In: **Evolution of Crop Plants**, New York: Smart, J. e Simmonds, N. W., 1995, p531.
- GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.
- HANNA, W. W. Application of cytogenetics to plant breeding. In: THE SOUTHERN PASTURE AND FORAGE CROP IMPROVEMENT CONFERENCE, **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Gainesville, 1980.
- KATIYAR, S.K.; SACHAN, J. K. S. Pachytene chromosome morphology of Coix aquatica and its comparison with Zea chromosomes. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Missouri, v.66, p.91, 1992.
- LEWIS, K.R.; JONH, B. **The matter of mendelian heredity**. London: Churchill, 1964. 296p.
- LLUGANY, M; MASSOT, N.; WISSEMEIER, A.H.; POSCHENRIEDER, C.; HORST, W.J.; BARCELO, J. Aluminium tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. **Plant Breeding**. Berlin, v.157, n.6, p.447-451, 1994.

- LOVE, R. M. **Estudos citológicos preliminares de trigo Rio-Grandenses**. Porto Alegre: Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Industria e Comércio, 1949.. 23p. (circular, 74).
- LÜBBERSTENT, T.; DUSSLE, C.; MELCHINGER, A. E. Application of microsatellites from maize to teosinte and other relatives of maize. **Plant Breeding**, Berlin, v.117, p.447-450, 1998.
- MANGELSDORF, J.; REEVES. Maize. In: **Evolution of Crop Plants**: New York: Smart, J. e Simmonds, N. W., 1939, p531.
- MATSUOKA, Y.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M. DOEBLEY, J. Microsatellites in Zea-variability, patterns of mutations and use for evolutionary studies. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v.104, p.436-450, 2002.
- MOLINA, M. C.; POGGIO, L.; NARANJO, C. Cytogenetic analysis Zea mays ssp. mays x Z. mays ssp. parviglumis end Z. mays ssp. mays x mays ssp. mexicana. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, n.107, v.66, p.60, 1992.
- NARANJO, C. A.; MOLINA, M. C.; POGGIO, L. **Evidenciais de número básico x=5 em género Zea y su importancia em el estudio del origen del maíz**. Academia Nacional de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Monografía, Buenos Aires, p.43-53,1990.
- PAABO, S. Neolithic genetic engineering. **Nature**, London. v.398, n.6724, p.194-195, 1999.
- PASZTOR, K.; BORSOS, O. Inheritance and chemical composition in inbred maize (Zea mays L.) X teosinte (Zea mays subsp. mexicana Schrader/ Iltis) hybrids. (Preliminary communication). **Novenytermeles**. Budapest, v.39, n.3, p.193-213, 1990.
- PEJIC, I.; MARSAN, P.A.; MORGANTE, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v.97, p.1248-1255, 1998.
- PODOL'-Skaya, A. P. Prospects for using perennial diploid teosinte (Zea diploperennis) in breeding maize (Zea mays). **Nauchno Tekhnicheskii Byulleten' Vsesoyuznogo Ordena Lenina i Ordena Druzhby Narodov Nauchno Issledovatel'skogo Instituta Rastenievodstva Imeni N. I. Vavilova**, n.183, p.25-27, 1988.
- POGGIO, L.; CONFALONIERI, V.; COMAS, C.; GONZALES, G.; NARANJO, C. A. Evolution relationships in the genus Zea: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. **Genetica and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.4, p.1021-1027, 2000.
- POGGIO, L.; NARANJO, C. A.; ROSATO, C. L. M.; MAZOTI, L. B. Cytological studies in alloplasmic lines of maize. **Maize Genetics Cooperation News**

- Letter**, Missouri, n.68, p.52, 1994.
- POGGIO, L.; ROSATO, M.; MAZOTI, L. B.; NARANJO, C. A. Variable meiotic behaviour among plants of an alloplasmic line of maize. **Cytological**, Tokyo, v.62, n.3, p.271-274, 1997a.
- POGGIO, L.; ROSATO, M.; NARANJO, C. A. Meiotic behavior and DNA content in alloplasmic lines of maize. **Genome**. Ottawa, v.40, n.5, p.723-729, 1997b.
- RAMESHA, M. S.; SACHAN, J. K. S. Cytoplasmic effect on chromosome pairing in maize-teosinte hybrids. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, n.67, p.85, 1993.
- RHOADES, A. Maize. In: **Evolution of Crop Plants**: New York: Smart, J. e Simmonds, N. W. 1951. 531p.
- ROHLF F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Software, 2000, 38p. (version 2.1).
- SACHAN, J. K. S.; NATH, Y. Interracial differences in mechanical properties of the cob in relation to knob composition. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, n.68, p.68-69, 1994.
- SAGHAI-MARROF, M. A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and populations dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.81, p.8014-8018, 1984.
- SENIOR, M. L. et al. Utility of SSR for determining genetic similarities and relationships in maize using agarose gel system. **Crop Science**, Madison, v.38, n.4, p.1088-1098, 1998.
- SHARMA, R. C.; PAYAK, M. M. Disease reaction of wild relatives of maize to erwinia stalk rot and helminthosporium leaf blight. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, n.69, p.111-112, 1995.
- SHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, J. Arlequin, ver.2.01: **A software for population genetic data analysis**. Genetics Laboratory, University of Geneva, Switzerland. Disponível em: <http://lgb.unige.ch/arlequin/software>, 2000.
- SRINIVASAN, G.; BREWBAKER, J. L. Genetic analysis of hybrids between maize and perennial teosinte. II Ear traits. **Maydica**, Bergamo, v.44, n.4, p.371-384, 1999.
- STEBBINS, G. K. **Processes of organic evolution**: Logman. New York. 339p. 1971.
- SWARUP, S.; TIMMERMANS, M. C. P.; CHAUDHURI, S.; MESSING, J. 1995 Determinants of the high-methionine trait in wild and exotic germplasm may

- have escaped selection during early cultivation of maize. *Plant Journal*. London, v.8, n.3, p.359-368, 1995.
- SYBENGA, J. **Cytogenetics in Plant Breeding**: SpringerVerlang. Berlin.. 1993. 469p.
- SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a peersonal view: ***Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement***. Vienna, 1998. 222p.
- SZABÓ, V. M.; BURR, B. Simple inheritance of key traits distinguishing maize and teosinte. ***Molecular General. Genetics***, Berlin, v.252. p.33-41, 1996.
- VITORINO, P. G. et al. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***. Brasília, v.36, n.8, p.1027-1035, 2001.
- WANG, R.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L.; DOEBLEY, J.; WANG, R. L. The limits of selecion during maize domestication. ***Nature***, London. v.398, n.6724, p.236-239,1999.
- WEIR, B. S. **Genetic data analysis**. Sunderland: Sinauer, 1996. 445p.
- WILLIAMS, C. G.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Comparavite recombination distance among Zea mays L - Inbreds, wide crosses and interspecific hybrids. ***Genetics***, Ottawa, v.141, n.4, p.1573-1581, 1995.
- ZHOU, H.; DENG, Y.; Zhou, H. S.; Deng, Y. H.; Li, J. X. 1997 Inbred selection from distant hybridization of maize (Zea mays L.) X teosinte (Zea diploperennis L.). ***Acta Agronomica Sinica***. v.23, n.3, p.333-337, 1997.