

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

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE TEOSINTO (*Zea mays*  
subsp. *mexicana*) VISANDO À CONTRIBUIÇÃO PARA O MELHORAMENTO  
GENÉTICO DO MILHO (*Zea mays* subsp. *mays*)

Tatiana de Freitas Terra  
Bióloga/PUCRS - Msc. Fitotecnia/UFRGS

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

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março de 2009



Àqueles cuja presença será sempre lembrada  
e a ausência sempre sentida:

Adelaide Ondina,  
Suely  
e Marcelo,

dedico.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.”

(Amyr Klink)

## AGRADECIMENTOS

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

À professora e orientadora Dra. Maria Jane Cruz de Melo Sereno, por ter permitido que o convívio profissional se transformasse em amizade, pelo estímulo nas horas difíceis e auxílio constante.

Ao co-orientador Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva, pelo apoio e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. José Fernandes Barbosa Neto, por sua paciência, pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

Aos participantes desta banca examinadora, Dra. Sandra Brammer, Dra. Janaina Kraemer e Dr. Leo Duc da Conceição, por terem aceitado este convite.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Plantas de Lavoura, pela eficiência demonstrada no auxílio a este trabalho. Em especial, agradeço a Alice, Marisa e Adroaldo pela atenciosa convivência diária.

À minha “fiel escudeira” Paula Wiethölter, por ter se revelado uma pessoa indispensável na minha vida e por ter permitido que eu invadissem a sua, demonstrando altruísmo e um conhecimento sobre mim que nem eu mesma possuía, bem como ao Ricardo, pelo exemplo de pessoa, por ter dado importância e recebido como sua essa relação de amizade.

Às amigas Josana e Thanise, por toda assistência prestada, pela dedicação de sempre e por permitirem a construção de uma valiosa amizade.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura, pelo companheirismo, preciosa ajuda e incentivo nos momentos de total descrença, especialmente, a Fábio e Jonatan.

A todos os demais amigos e colegas de curso, em especial, a Fernanda Bortolini, pela amizade e valioso auxílio nas análises, a Precila, pelo companheirismo e ao Tonon, pelo coleguismo e respeito demonstrados.

Às bolsistas de Iniciação Científica, Ana Paula, Carolina, Andressa e Viviane, pela colaboração na coleta dos dados e na execução das mais diversas atividades realizadas em prol do trabalho.

Ao pessoal do Departamento de Genética dessa Universidade, em especial a Dra. Fernanda Bered, pelo exemplo de profissional e pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao pessoal do laboratório de Citogenética Vegetal e Eletroforese do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, em especial, a Ionara, Nair, Diva e Ana Paula, pelo auxílio prestado e pela harmoniosa convivência no desenvolvimento de parte desse trabalho, bem como a Dra. Maria Teresa Schifino-Wittmann, por ceder às dependências de seu laboratório.

As amigas de sempre, Joseane, Luana e Caroline, pela constante torcida e companheirismo dos momentos mais difíceis, mas principalmente, ao amigo Toni, por todo seu desprendimento e capacidade de doação às minhas causas.

À amiga Andréa, por se fazer presente, mesmo distante.

Ao meu amor e companheiro Victor, pela sua dedicação, paciência e amor, que mesmo sem total compreensão, soube respeitar as renúncias e fez seu o meu ideal de realização.

A todos familiares, tios, tias, primos e primas pela torcida e contribuição, em especial, a Geni e Regina Chiesa, por representarem a propulsão para o início deste sonho.

À minha irmã Siomara, pelo amor, respeito e apoio em todos os momentos importantes da minha vida, bem como na realização desta conquista.

À irmã, amiga e comadre Letícia, por seu apoio incondicional em todos os momentos que mais precisei.

À minha mãe Maria Elena, por ter me ensinado grande parte dos valores que tenho, pelo amor incondicional, apoio sem restrições e por sonhar o mesmo sonho comigo.

Ao meu pai Olimar, por ter sempre demonstrado orgulho e respeito pelas minhas escolhas e por estar sempre disposto a me auxiliar em nome do afeto.

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

# VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE TEOSINTO (*Zea mays* subsp. *mexicana*) VISANDO À CONTRIBUIÇÃO PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DO MILHO (*Zea mays* subsp. *mays*)<sup>1</sup>

Autor: Tatiana de Freitas Terra  
Orientadora: Maria Jane Cruz de Melo Sereno  
Co-orientador: Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

## RESUMO

O milho (*Zea mays* subsp. *mays*) foi domesticado a cerca de 8000 anos, a partir do teosinto. A variação genética das populações domesticadas de milho pode ter sido reduzida pela deriva e pela seleção, promovida pelos primeiros agricultores. Diversos trabalhos indicam que o genoma do milho cultivado apresenta uma perda de variabilidade quando comparado ao seu ancestral silvestre. É nesta variabilidade, pertencente ao teosinto, que se podem identificar alelos de interesse agrônomo para a cultura do milho, tais como os relacionados com tolerância a estresses bióticos e abióticos. Apesar da proximidade existente entre milho e teosinto, poucos trabalhos caracterizam este táxon. Os objetivos deste estudo foram analisar a variabilidade genética de duas populações de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*), a partir de análises fenotípicas, bioquímicas e moleculares e avaliar a compatibilidade dos cruzamentos dirigidos entre milho e teosinto, a partir da viabilidade dos grãos de pólen e da obtenção de populações segregantes. Os genótipos foram analisados através de oito caracteres fenotípicos, 12 bandas isoenzimáticas e 25 locos microssatélites. Os dados morfológicos demonstraram elevada diversidade genética entre as populações de teosinto (0,84), concordando com a similaridade média obtida pelos dados de esterase (0,24). Entre os 25 locos microssatélites analisados, 88% apresentaram polimorfismo, com uma média de 2,5 alelos por loco e divergência genética reduzida entre as populações (0,14). A estrutura genética das populações foi considerada moderadamente alta, com um coeficiente de endogamia de 0,44. Também foi observado moderado grau de diferenciação genética (0,15) e reduzido fluxo gênico entre as populações de teosinto. Foi observada uma elevada frequência de grãos de pólen viáveis (acima de 90%), sugerindo ausência de barreiras citológicas entre milho e teosinto. Os cruzamentos indicaram incompatibilidade entre as duas subespécies e presença de barreiras genéticas. Este trabalho representa uma contribuição para a caracterização da variabilidade genética em teosinto e indica o potencial deste germoplasma silvestre como recurso genético para o melhoramento de milho.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (161 p.) Março, 2009.

# GENETIC VARIABILITY IN TEOSINTE (*Zea mays* subsp. *mexicana*) IN ORDER TO CONTRIBUTE TO MAIZE (*Zea mays* subsp. *mays*) BREEDING<sup>2</sup>

Autor: Tatiana de Freitas Terra  
Orientadora: Maria Jane Cruz de Melo Sereno  
Co-orientador: Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

## ABSTRACT

Maize (*Zea mays* subsp. *mays*) was domesticated about 8000 years ago, from teosinte. Genetic variability of domesticated maize populations may have been reduced due to genetic drift and early farmer's selection. There is scientific indication that the cultivated maize genome presents a loss of variability when compared with its wild ancestral. The variability present in teosinte germplasm, which was not selected during domestication, can be used to identify alleles for important agronomic traits for maize, such as related with biotic and abiotic stress tolerance. Although teosinte is closely related to maize, there are few works on characterization of this subspecies. The objectives of this study were to analyze the genetic variability of two populations of teosinte (*Zea mays* subsp. *mexicana*), through phenotypic, biochemic and molecular analysis, and to evaluate the compatibility of oriented crosses between maize and teosinte from segregant populations and of pollen grains viability. The genotypes were analyzed through eight phenotypic traits, 12 isozymes bands and 25 microsatellites loci. The phenotypic data indicated high genetic variability (0.84) between the teosinte populations, agreeing with the average similarity (0.24) of esterases data. Amongst 25 analyzed SSR loci, 88 % presented polymorphism, with an average of 2.5 alleles/locus, and reduced genetic distance between the populations (0.14). The genetic structure of the populations was considered to be moderately high, presenting a coefficient of endogamy of 0.44. Also was observed moderate genetic differentiation (0.15) and reduced gene flow between the populations. It was observed a high frequency of viable pollen grains (above of 90%), suggesting absence of cytological barriers between maize and teosinte. The crossings had indicated incompatibility between the two subspecies and presence of genetic barriers. This work represents a contribution for the characterization of the genetic variability in teosinte and indicates the potential of this wild germplasm as genetic resource for maize breeding.

---

<sup>2</sup> Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (161 p.) March, 2009.

## SUMÁRIO

|   | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1      |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 4      |
| 2.1 Histórico.....  | 4      |
| 2.2 Taxonomia do gênero <i>Zea</i> .....  | 5      |
| 2.3 Origem, evolução e domesticação.....  | 8      |
| 2.4 Caracterização geral: milho x teosinto.....                                   | 14     |
| 2.5 Variabilidade genética x melhoramento genético.....                           | 17     |
| 2.5.1 Marcadores fenotípicos.....   | 19     |
| 2.5.2 Marcadores bioquímicos.....   | 22     |
| 2.5.2.1 Sistema das esterases (EST – EC. 3.1.1.1).....                            | 25     |
| 2.5.3 Marcadores moleculares.....   | 27     |
| 2.5.3.1 Microsatélites (SSR).....   | 29     |
| 2.6 Citogenética.....   | 34     |
| 2.6.1 Considerações gerais.....   | 34     |
| 2.6.2 Citogenética x melhoramento genético.....                                   | 35     |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 40     |
| 3.1 Estimativas da variabilidade genética.....                                    | 41     |
| 3.1.1 Análises fenotípicas.....   | 41     |
| 3.1.2 Análises bioquímicas.....   | 43     |
| 3.1.2.1 Germinação do material.....   | 44     |
| 3.1.2.2 Eletroforese de isoenzimas.....   | 45     |
| 3.1.2.3 Extração de proteínas.....  | 45     |
| 3.1.2.4 Preparo dos géis de poliacrilamida.....                                   | 46     |
| 3.1.2.5 Aplicação dos extratos foliares.....                                      | 47     |
| 3.1.2.6 Separação das amostras.....   | 47     |
| 3.1.2.7 Coloração, revelação e fixação.....                                       | 48     |
| 3.1.2.8 Análise dos dados.....  | 49     |
| 3.1.3 Análises moleculares.....   | 50     |
| 3.1.3.1 Extração do DNA total.....  | 51     |
| 3.1.3.2 Condições de PCR e amplificação do DNA.....                               | 51     |
| 3.1.3.3 Eletroforese e identificação genética.....                                | 53     |
| 3.1.3.4 Análise dos dados.....  | 53     |
| 3.2 Formação de gerações segregantes para análises dos cruzamentos dirigidos..... | 54     |
| 3.2.1 Geração $F_1$ .....   | 57     |
| 3.2.2 Primeira geração de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ ).....                      | 58     |
| 3.2.3 Geração $RC_1F_2$ (autofecundações).....                                    | 60     |
| 3.2.4 Análise dos cruzamentos dirigidos a partir da viabilidade                   |        |

|   | Página |
|---|--------|
| dos grãos de pólen.....   | 60     |
| 3.2.4.1 Coleta, fixação e estocagem do material.....                                  | 61     |
| 3.2.4.2 Preparo das lâminas.....  | 62     |
| 3.2.4.3 Análise dos dados.....  | 62     |
| 3.2.5 Análise dos cruzamentos dirigidos a partir da média de sementes.....            | 63     |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 64     |
| 4.1 Estimativas da variabilidade genética.....  | 64     |
| 4.1.1 Análises fenotípicas.....   | 64     |
| 4.1.1.1 Distância genética.....   | 75     |
| 4.1.2 Análises bioquímicas.....   | 78     |
| 4.1.3 Análises moleculares.....   | 84     |
| 4.1.3.1 Padrão dos microssatélites.....   | 84     |
| 4.1.3.2 Diversidade genética.....   | 85     |
| 4.1.3.3 Estruturação das populações e fluxo gênico.....                               | 91     |
| 4.2 Análise dos cruzamentos dirigidos a partir da viabilidade dos grãos de pólen..... | 96     |
| 4.3 Análise os cruzamentos dirigidos a partir da média de sementes...                 | 102    |
| 5. CONCLUSÕES.....  | 108    |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 109    |
| 7. APÊNDICES.....   | 127    |
| 8. VITA.....  | 161    |

## RELAÇÃO DE TABELAS

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Descrição de locos microssatélites analisados em duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). Loco microssatélites, gene relacionado, cromossomo e motivo dos microssatélites utilizados na análise molecular. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.....  | 52     |
| 2. Cruzamentos dirigidos para o desenvolvimento da geração F <sub>1</sub> . EMBRAPA – Pelotas, RS. 2006.....  | 58     |
| 3. Cruzamentos dirigidos para o desenvolvimento da primeira geração de retrocruzamento (RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> ). Pelotas e Eldorado do Sul, RS. 2007.....  | 59     |
| 4. Genótipos avaliados quanto à viabilidade dos grãos de pólen nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito), nas linhagens (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), nas populações F <sub>1</sub> s e nas populações de retrocruzamento (RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> s), obtidas de cruzamentos entre milho e teosinto. Eldorado do Sul e Porto Alegre, RS. 2007-2008.....  | 61     |
| 5. Resumo da análise de variância (QME) nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e nas testemunhas (linhagens de milho P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), em relação aos caracteres estatura (EST), altura de inserção da espiga (INSE), comprimento do internódio (CI), número de internódios (NI), número de folhas acima da primeira espiga (NFACE), número de folhas abaixo da primeira espiga (NFABE), comprimento da folha de inserção da primeira espiga (CFIE) e largura da folha de inserção da primeira espiga (LFIE), avaliados em Pelotas e em Eldorado do Sul, RS. 2006-2007.. | 67     |
| 6. Análise da interação genótipo x ambiente dos caracteres fenotípicos avaliados nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e nas testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), através do Teste Tukey-Kramer com médias ajustadas (LSMean). Pelotas e Eldorado do Sul, RS. 2006-2007.....  | 71     |
| 7. Padrão de 25 locos microssatélites analisados em duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). Locos, número de alelos identificados, tamanho dos alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de cada loco. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008....   | 88     |

|   | Página |
|---|--------|
| 8. Medidas de diversidade genética, obtidas pela análise de 22 locos microssatélites. Número ( $N^{\circ}$ ) de alelos, estimativas da heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.....       | 90     |
| 9. Estimativas da estatística F de Wright (1943), obtidas pela análise de 22 locos microssatélites. Coeficiente de endogamia ( $f$ ), grau de diferenciação genética ( $\Theta$ ) e fluxo gênico ( $Nm$ ) nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.....                  | 93     |
| 10. Viabilidade dos grãos de pólen avaliada nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito), nas linhagens (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), nas populações $F_1$ s e nas populações de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ s), obtidas de cruzamentos entre milho e teosinto. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008..... | 97     |
| 11 Estimativa da compatibilidade dos cruzamentos entre milho e teosinto para obtenção de populações de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ 's), realizados em Pelotas e em Eldorado do Sul, RS. 2007.....   | 103    |
| 12 Estimativa da compatibilidade dos cruzamentos entre milho e teosinto para obtenção de populações de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ 's e $RC_1F_2$ 's), realizados em Porto Alegre, RS. 2008.....  | 104    |

## LISTA DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Morfologia das plantas de teosinto e de milho. A) ( <i>Zea mays</i> subsp. <i>mexicana</i> ) e B) ( <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> ). Fotos modificadas de White & Doebley (1998).....   | 16     |
| 2. Morfologia das inflorescências femininas. A) de milho e B) de teosinto. Fotos modificadas de Wang <i>et al.</i> (2005).....  | 16     |
| 3. Germinação de sementes de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) em sala de crescimento. A) dois dias após a semeadura B) 15 dias após a semeadura. Fotos: Terra, T. F. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.....   | 45     |
| 4. Metodologia adotada nos cruzamentos dirigidos. A) proteção da espiga com saco plástico; B) coleta dos grãos de pólen com saco de papel; C) grãos de pólen recolhidos no saco de papel; D) espiga pronta para receber os grãos de pólen; E) grãos de pólen vertidos sobre a espiga; F) proteção da espiga após o cruzamento. Fotos: Terra, T. F. EEA-UFRGS – Eldorado do Sul, RS. 2007.....                 | 56     |
| 5. Agrupamento baseado na Distância Euclidiana (SAHN – NTSYS), em função dos caracteres agrônômicos avaliados em Pelotas e Eldorado do Sul, RS. 2006-2007.....  | 77     |
| 6. Dendograma obtido pelo coeficiente de similaridade de Jaccard para populações de teosinto e linhagens de milho (P2: 672733 e P5: 672736) utilizadas como testemunhas, a partir de análises de esterases. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.....   | 82     |
| 7. Viabilidade dos grãos de pólen. A) pólen de teosinto com formato regular; B) grãos de pólen regulares de teosinto; C) pólen de milho com formato regular; D) pólen de plantas F <sub>1</sub> com formato irregular; E) pólenes regulares de RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> e F) pólen regular de RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> . Fotos, Terra, T. F. (Escala: 10 µm). UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008..... | 99     |
| 8. Sementes resultantes dos cruzamentos dirigidos entre milho e teosinto. A) RC <sub>1</sub> F <sub>2</sub> : (P2xCanguçu) x P2; B) RC <sub>1</sub> F <sub>2</sub> : (P6xMonte Bonito) x P6; C) RC <sub>1</sub> F <sub>2</sub> : (P5xCanguçu) x P5 e D) RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : (P5xCanguçu) x P5. Fotos: Terra, T. F. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.....   | 105    |

9. Demonstração do ataque da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) a lavoura de milho. A) e B) pendões totalmente destruídos. Fotos: Terra, T. F. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008..... 106

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da variabilidade genética de espécies silvestres é fundamental para o melhoramento genético de espécies cultivadas. O germoplasma silvestre – quando adequadamente caracterizado – representa a possibilidade de melhoria de diversos caracteres agronômicos, ainda mais quando ocorre hibridação com espécies cultivadas com as quais são aparentadas e introgressão dessas características. Dessa forma, o germoplasma silvestre pode constituir um importante reservatório de genes, tais como os relacionados com tolerância a estresses abióticos e com resistência a doenças.

Em se tratando de culturas de alto valor econômico, como o milho (*Zea mays* subsp. *mays*), a importância do estudo das espécies silvestres relacionadas é elevada, dada a necessidade de variabilidade genética nos materiais que, cada vez mais, apresentam maior uniformidade genética e, conseqüentemente, maior predisposição aos estresses inesperados.

Diversos trabalhos têm demonstrado elevadas taxas de decréscimo na diversidade genética em inúmeras linhagens e variedades comerciais de milho. Isso vem ocorrendo porque a grande maioria dos genótipos superiores tem sido desenvolvida a partir de um número muito limitado de materiais elite, os

quais, por sua vez, apresentam uma base genética bastante restrita, conseqüência direta da forte seleção exercida sobre eles.

O milho é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz. Apesar da grande variabilidade genética existente nesta subespécie – a qual permite que ela seja cultivada nas mais variadas regiões do mundo – a busca de variabilidade em germoplasma relacionado continua sendo importante para o melhoramento genético da cultura. Entretanto, para que os materiais silvestres possam ser aproveitados para essa finalidade, eles necessitam ser identificados e caracterizados.

O teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) é uma subespécie utilizada para a alimentação animal, como forragem de corte para o gado leiteiro, principalmente, no sul do Brasil. Apesar de ser muito próximo ao milho, existem poucos trabalhos envolvidos com a caracterização dessa subespécie. De acordo com Fukunaga *et al.* (2005), o teosinto representa um importante recurso para os estudos genéticos, evolutivos e para o melhoramento genético do milho, ainda que não tenha sido extensivamente utilizado para esse fim.

Diversos trabalhos indicam que o genoma do milho cultivado apresenta uma perda de variabilidade genética quando comparado ao germoplasma do seu ancestral silvestre. É nesta variabilidade pertencente ao teosinto, que se podem identificar alelos de interesse agrônomo para o milho cultivado que, constantemente, necessita de ampliação da sua base genética. Um exemplo clássico desta necessidade foi a catástrofe ocorrida em 1970 nos Estados Unidos, em função de uma epidemia causada pela ocorrência de *Helminthosporium maydis*.

A caracterização da variabilidade genética pode ser realizada através de análises fenotípicas, avaliando caracteres de importância agrônômica, análises bioquímicas e moleculares, avaliando marcadores isoenzimáticos e de DNA, respectivamente. A detecção de variabilidade, através de marcadores isoenzimáticos e moleculares, permitem também o acesso a informações quanto à estrutura das populações, fluxo gênico, relações filogenéticas, padrões biogeográficos, além de análises de paternidade e de parentesco.

Além da importância da caracterização dos materiais silvestres, o conhecimento da possibilidade de hibridação entre silvestres e cultivadas também é imprescindível para o aproveitamento da variabilidade genética.

Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram analisar a variabilidade genética de duas populações de teosinto, através de análises fenotípicas, bioquímicas (isoenzimas de esterase) e moleculares (marcadores microssatélites), bem como avaliar a compatibilidade dos cruzamentos dirigidos entre milho (*Zea mays* subsp. *mays*) e teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*), a partir da estimativa de viabilidade dos grãos de pólen e através da obtenção de populações segregantes.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Histórico**

As primeiras descrições da existência de milho na costa norte de Cuba foram realizadas em 1492. Provavelmente, Cristóvão Colombo tenha sido o responsável pela dispersão da espécie na Europa, ao regressar à Espanha, em 1493, embora sejam prováveis contatos anteriores de europeus com o Novo Mundo (Goodman, 1987). Nessa mesma época, o milho era cultivado do sul do Canadá ao centro do Chile e pouco cultivado na parte central dos Estados Unidos, apesar de muito utilizado pelos índios do Novo Mundo. As evidências indicam que os povos indígenas americanos iniciaram o cultivo e, conseqüentemente, a domesticação e a seleção do milho (entre 8.000 e 10.000 anos atrás) tendo sido a principal cultura de importantes civilizações como, por exemplo, os astecas, os maias e os incas (Machado & Paterniani, 1998; Paterniani & Campos, 1999). Atualmente, o milho é cultivado praticamente em todas as regiões do mundo (Goodman, 1987).

Os primeiros escritores e exploradores apresentaram descrições variadas de tipos de milho cultivados nestas diferentes áreas. As primeiras descrições sugeriam que o tipo de milho cultivado era colorido e farináceo, com endosperma branco. Nas regiões litorâneas do Brasil, a maior parte do milho foi descrito como branco e duro. Entretanto, essas formas foram seguidas de

muitas outras, até de endospermas com variações de preto, vermelho ou roxo. Atualmente, sabe-se da extraordinária variabilidade existente nos tipos de milho cultivado, os quais variam de duro a semi-dentado, sendo que o endosperma amarelo é a coloração mais comum (Goodman, 1987).

## **2.2 Taxonomia do gênero *Zea***

Uma complexa e extensa história evolutiva aliada à adaptação a uma ampla variedade de ambientes contribuiu para as dificuldades de construção de um sistema taxonômico adequado para a cultura (Stebbins & Crampton, 1961).

O milho é uma gramínea anual, pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L. Taxonomicamente é identificado como *Zea mays* L. subsp. *mays* (Machado & Paterniani, 1998; Paterniani & Campos, 1999). O gênero *Zea* é composto de um grupo de espécies anuais e perenes nativas do México e América Central e inclui o táxon silvestre conhecido como teosinto (*Zea* spp.), estreitamente relacionado ao milho cultivado (Buckler & Stevens, 2005). Além da ocorrência natural nas regiões onde é nativo, o teosinto é cultivado em diversas áreas do globo, como o sul dos Estados Unidos, Ilhas do Caribe, América do Sul, Índia e Paquistão (Relwani, 1968). O teosinto representa um importante recurso para estudos genéticos, evolutivos e para o melhoramento genético do milho – ainda que não tenha sido extensivamente utilizado para esse fim (Fukunaga *et al.*, 2005). Sua principal utilização está relacionada à alimentação animal, como forragem de corte (Motta & Maia, 1999) uma vez que o uso no pastejo é inviável devido à fragilidade de seu enraizamento (informação verbal).

Por muito tempo o relacionamento dentro do gênero *Zea* esteve sujeito a muitas controvérsias. A principal dificuldade na taxonomia do milho, bem como na identificação de seus parentes próximos está na ausência de uma estrutura reprodutiva feminina como a “espiga” em qualquer outra espécie conhecida.

De fato, milho e teosinto apresentam diferenças de origens agronômicas, onde a maior diferença entre eles está na arquitetura de suas inflorescências (Galinat, 1971). Fato que fez com que os botânicos do século XIX falhassem no reconhecimento do relacionamento estreito entre os dois e determinasse o teosinto como membro do gênero *Euchlaena* (Buckler & Stevens, 2005).

A respeito dessas opiniões conflitantes, diversos estudos morfológicos, citológicos e genéticos foram realizados dentro do gênero *Zea* com o objetivo de elucidar as dúvidas relativas ao relacionamento existente entre essas subespécies que compõem o gênero. Wilkes (1967) apresentou um esquema de classificação utilizando diferentes populações geográficas, com determinações raciais baseadas na distinção de características morfológicas. Na década de 80, Doebley & Iltis (1980) publicaram um sistema de classificação descrevendo o provável relacionamento evolutivo dentro do táxon. Sanchez *et al.* (1998) desenvolveram uma caracterização mais adequada para este gênero, com análises de locos de caracteres quantitativos (*QTL - Quantitative Trait Loci*) e a descoberta de populações adicionais. De acordo com a revisão de Buckler & Stevens (2005), cinco espécies do gênero *Zea* são reconhecidas atualmente – baseada nas características morfológicas e nos delineamentos geográficos estabelecidos:

- I. *Zea diploperennis*: teosinto diplóide e perene, encontrado em regiões muito limitadas das montanhas do oeste do México;
- II. *Zea perennis*: teosinto tetraplóide e perene, também com distribuição restrita as montanhas do oeste do México;
- III. *Zea luxurians*: teosinto diplóide e anual, encontrado em regiões equatoriais do sudeste da Guatemala e Honduras;
- IV. *Zea nicaraguensis*: teosinto diplóide, anual e muito próximo ao *Zea luxurians*, é encontrado na Nicarágua;
- V. *Zea mays* L.: compreende espécies diplóides e anuais, altamente polimórficas, incluindo outros teosintos e o milho cultivado.

Essa última espécie foi subdividida em quatro subespécies diplóides ( $2n = 20$  cromossomos):

- I. *Z. mays* L. subsp. *huehuetenangensis*: teosinto anual encontrado em poucas montanhas do noroeste da Guatemala;
- II. *Z. mays* L. subsp. *mexicana*: teosinto anual das montanhas das regiões central e norte do México;
- III. *Z. mays* L. subsp. *parviglumis*: teosinto anual, comum no sudoeste do México;
- IV. *Z. mays* L. subsp. *mays*: milho, provavelmente domesticado no sul do México.

### 2.3 Origem, evolução e domesticação

O possível local (ou locais) do qual o milho domesticado tenha se originado tem sido amplamente discutido, entretanto, com base nas evidências atuais, é mais provável que tenha se originado no México (Paterniani & Viégas, 1987). Mesmo que existam incertezas relacionadas à verdadeira origem desta espécie, não existem dúvidas de que o milho é um cereal americano, sendo mencionadas áreas de cultivo desta espécie desde o Paraguai até a Colômbia na América do Sul, assim como na Guatemala e no México, na América Central e América do Norte. Além disso, no continente americano se encontram os seus parentes selvagens mais próximos: os teosintos e o *Tripsacum* (Paterniani & Campos, 1999).

Existem diversas teorias quanto à origem do milho, porém a mais aceita, é que tenha se originado diretamente do teosinto (Paabo, 1999; Paterniani & Campos, 1999; Wang *et al.*, 1999). Evidências genéticas e citológicas indicam que milho e teosinto são extremamente aparentados (White & Doebley, 1998; Takahashi *et al.*, 1999; Poggio *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2002a; Doebley, 2004; Doebley *et al.*, 2006).

Análises da composição dos knobs (estruturas celulares presentes no núcleo das células de milho, com função ainda muito discutida) foram amplamente estudadas, objetivando a resolução do problema da origem do milho (Aguiar-Perecin, 1987). A primeira teoria que considerou os knobs importantes foi desenvolvida por Reeves & Mangelsdorf (1942), na qual o milho selvagem original era desprovido dessas estruturas e ao ser hibridizado com o *Tripsacum* (que possui vários knobs terminais), resultou em um híbrido, que retrocruzou com o milho e deu origem a novas variedades de milho. Portanto,

os knobs que o milho e o teosinto possuem seriam originários do *Tripsacum*. Entretanto, uma série de autores discorda desta teoria, principalmente, em função da disposição dos knobs, que no *Tripsacum* são terminais, enquanto que no milho e no teosinto são intercalares. Com a tendência em aceitar que os knobs do milho moderno são originários do teosinto, é importante destacar que a análise dessas estruturas tem contribuído muito para resolução do problema de evolução, bem como, para correlacionar e caracterizar raças de milho (Aguiar-Perecin, 1987). Esses estudos, em teosintos mexicanos, permitiram importantes correlações entre milho e teosinto, onde as características em comum na constituição cromossômica e as semelhanças de constituição dos knobs, acompanhando suas distribuições geográficas, estabeleceram informações importantes (Aguiar-Perecin, 1987).

Basicamente, existem quatro hipóteses para explicar as origens do milho e do teosinto, embora para cada uma delas existam várias interpretações (Paterniani & Viégas, 1987). A hipótese mais simples é da “origem comum” ou “evolução divergente” (Weatherwax, 1954, 1955 e Randolph, 1955, 1959, 1976), a qual sugere que o milho, o teosinto e o *Tripsacum* se originaram de um ancestral comum, sendo que o *Tripsacum* teria se diferenciado antes do milho e do teosinto. A segunda hipótese sugere que o milho originou-se diretamente do teosinto, por ação da seleção humana. Existem diversos trabalhos indicando que o genitor do milho seria ou *Zea mays* subsp. *mexicana* ou *Zea mays* subsp. *parviglumis*, ambos conhecidos como teosintos (Galinat, 1977; White & Doebley, 1998; Paabo, 1999; Paterniani & Campos, 1999; Takahashi *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Piperno & Flannery, 2001). Estas subespécies apresentam caracteres em comum, como o mesmo número de

cromossomos ( $2n = 20$ ), além de serem capazes de cruzar com o milho resultando em descendentes férteis (Goodman, 1995), apesar de já terem sido identificadas algumas barreiras genéticas entre elas (Evans & Kermicle, 2001; Terra, 2004). Essa hipótese é, atualmente, a mais aceita em função da definição de que são cinco os genes responsáveis pelas principais diferenças relacionadas com a morfologia do teosinto e do milho (Szabo & Burr, 1996), a qual tem sido reforçada por evidências moleculares que comprovam que existe uma relação de ligação entre esses locos. A terceira hipótese é de que as diversas formas de milho indicariam uma evolução independente a partir de várias espécies ancestrais (Goodman, 1995). Entretanto, Matsuoka *et al.* (2002b) discordaram desta hipótese ao genotiparem, com microssatélites, diversos genótipos de milho coletados entre o Canadá e o Chile.

Embora existam certas divergências de opiniões a respeito da origem do milho, do teosinto e do *Tripsacum*, as hipóteses concordam que o *Tripsacum* divergiu primeiro, e que milho e teosinto se diferenciaram bem mais tarde. Atuais evidências botânicas, arqueológicas e trabalhos de melhoramento de plantas, demonstram que milho e teosinto continuaram a evoluir desde aquela época. A quarta hipótese sugere que o milho, após a sua formação, teria 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 essa 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 esses elementos, que são caracterizados como agentes móveis do genoma que apresentam a habilidade de induzir diversos rearranjos

cromossomais, tais 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 qualquer forma, inúmeras evidências apontam que teosinto e milho são muito próximos (Doebley *et al.*, 1997).

De fato, ainda não é possível concluir a partir de que espécie o milho evoluiu. Por um lado, seus genitores poderiam estar extintos ou, por outro, o milho poderia ter se diferenciado de tal forma após a domesticação, que não haveria possibilidade de uma relação direta de ancestralidade com outra espécie. No entanto, é possível afirmar que entre as espécies mais próximas do milho cultivado está um teosinto, *Z. mays* subsp. *parviglumis* (Matsuoka *et al.*, 2002b).

Além das observações acima citadas, existem ainda diversos fatores genéticos que serão discutidos ao longo desse trabalho indicando que, provavelmente, o milho tenha surgido a partir do teosinto. Com a extensa utilização das técnicas moleculares e citogenéticas que apontam o estreito relacionamento entre milho e teosinto, estudos evolutivos têm sido focalizados na herança das diferentes características morfológicas existentes entre os mesmos. Regiões genômicas associadas a características fenotípicas (QTLs – *quantitative trait loci*) foram então determinadas, revelando que cinco segmentos cromossômicos controlam as principais características que distinguem milho e teosinto. Duas dessas regiões têm sido bem analisadas e dois locos foram responsabilizados pelas principais diferenças. Um deles é encontrado no cromossomo quatro e foi denominado de *teosinte glume*

*architecture1 (tga1)*, responsável pelas diferenças estruturais. O segundo loco está localizado no cromossomo um e é responsável por diferenças na arquitetura da planta, descrito como *teosinte branched1 (tb1)*, faz com que as plantas de milho lembrem as de teosinto (White & Doebley, 1998).

Durante muitos anos o milho foi considerado uma espécie diplóide que evoluiu por meio de seleção e recombinações entre genótipos (Mangelsdorf, 1974; Galinat, 1977; Goodman, 1978). Entretanto, existem evidências de que o milho possui uma origem alotetraplóide e que seu número cromossômico básico é de  $x = 5$  (Molina *et al.*, 1991; Poggio *et al.*, 1997 e Doebley *et al.*, 1997). Atualmente é aceito que um evento de poliploidização ocorrido após a divergência entre milho e sorgo – há cerca de 11 milhões de anos – resultou na duplicação do genoma do milho, com posterior rearranjo genômico e diploidização, tornando o cereal considerado como um poliplóide antigo (Gaut *et al.*, 2000). 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) foram observações decisivas relacionadas com a descoberta da poliploidia na espécie (Poggio *et al.*, 2000).

Já em relação à domesticação da espécie, existem evidências indicando que ela teria ocorrido entre 7.000 e 10.000 anos atrás (Doebley *et al.*, 1994; White & Doebley, 1998) por americanos nativos que, via intensa seleção, tornaram o milho o principal cultivo de importantes civilizações como a dos astecas, maias e incas (Galinat, 1985; Machado & Paterniani, 1998; Paterniani & Campos, 1999). Portanto, ao milho tem sido creditado o título de grão que civilizou o Novo Mundo. Estas primeiras comunidades utilizavam o milho não

somente para alimentação, mas também para arte e inspiração religiosa (Buckler e Stevens, 2005).

Apesar da ampla variabilidade genética e morfológica dentro das variedades crioulas de milho induzir inúmeros pesquisadores a propor múltiplas origens para a cultura (Kato, 1984), recentes análises filogenéticas baseadas em amostras de milho e teosinto indicam um único evento de domesticação (Matsuoka *et al.*, 2002b).

O milho domesticado é resultado de repetitiva interação com humanos, com o homem primitivo selecionando e plantando sementes com características desejáveis e, por sua vez, eliminando as que não possuíam essas características. Dessa forma, alelos favoráveis aumentaram em frequência dentro da população, enquanto alelos desfavoráveis diminuíram. E assim, com cada sucessiva geração de humanos, foram produzidas plantas mais semelhantes ao milho moderno e menos similares ao seu ancestral silvestre (Buckler & Stevens, 2005).

É importante ressaltar que a domesticação do milho contribuiu efetivamente com o seu desenvolvimento evolutivo. O homem primitivo foi habilidoso em selecionar, conscientemente ou não, combinações de mutações gênicas que, aos poucos, construíram uma espécie com características importantes que agora a distingue do seu parente mais próximo. Como resultado de milhares de anos de seleção fica uma espécie de ampla diversidade e de importância econômica mundial, porém extremamente dependente do homem.

## 2.4 Caracterização geral: milho x teosinto

Milho (*Zea mays* subsp. *mays*) e teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) diferem, dramaticamente, na morfologia de suas inflorescências, apesar de pertencerem à mesma espécie biológica. No milho são formados dois tipos distintos de inflorescências: uma feminina ou espiga e outra masculina ou pendão (Doebley *et al.*, 1991). O meristema apical origina o pendão terminal, com longas ramificações onde se desenvolvem as flores masculinas. As espigas são derivadas de meristemas axilares, possuem um eixo proeminente, sem nenhuma ramificação e desenvolvem as flores femininas (Bommert *et al.*, 2005).

Doebley & Stec (1993) definem que durante o processo de domesticação do milho, a seleção humana reduziu o número de espigas nas ramificações laterais, levando a concentração dos recursos da planta para uma única e grande espiga no ápice do ramo lateral.

A arquitetura das plantas é outra característica marcante de distinção entre milho e teosinto (Figura 1). A planta de teosinto é caracterizada por abundante perfilhamento, colmos espessos e com muitos nós (Motta & Maia, 1999), apresenta ramificações laterais com reduzidas espigas secundárias e inflorescências laterais primárias masculinas ou estaminadas. Este táxon apresenta espigas com quatro ou cinco cúpulas em uma única ramificação, completamente desarticuladas, com glumas endurecidas. Os genótipos de milho incluem colmo ereto e não ramificado, espigas com numerosas cúpulas, que permanecem intactas na maturidade da planta e glumas relativamente leves. Pouca ou nenhuma espiga secundária é encontrada no ramo lateral,

entretanto, ocorrem inflorescências laterais primárias femininas (Doebley & Stec, 1993).

Os mesmos autores indicam que a gluma endurecida do teosinto, serve para proteção do grão, tornando-o inacessível ao consumo humano. Dessa forma, as mudanças de gluma endurecida para a leve e de grãos totalmente encapsulados para absolutamente expostos, teriam sido cruciais para a transformação do teosinto no milho cultivado.

O arranjo dos órgãos ao longo da inflorescência é um caráter fundamental na distinção entre milho e teosinto (Figura 2). Por ser um componente importante da produção de grãos (número de fileiras de grãos por espiga), esse caráter tem estado sob permanente seleção humana (Doebley & Stec, 1993).

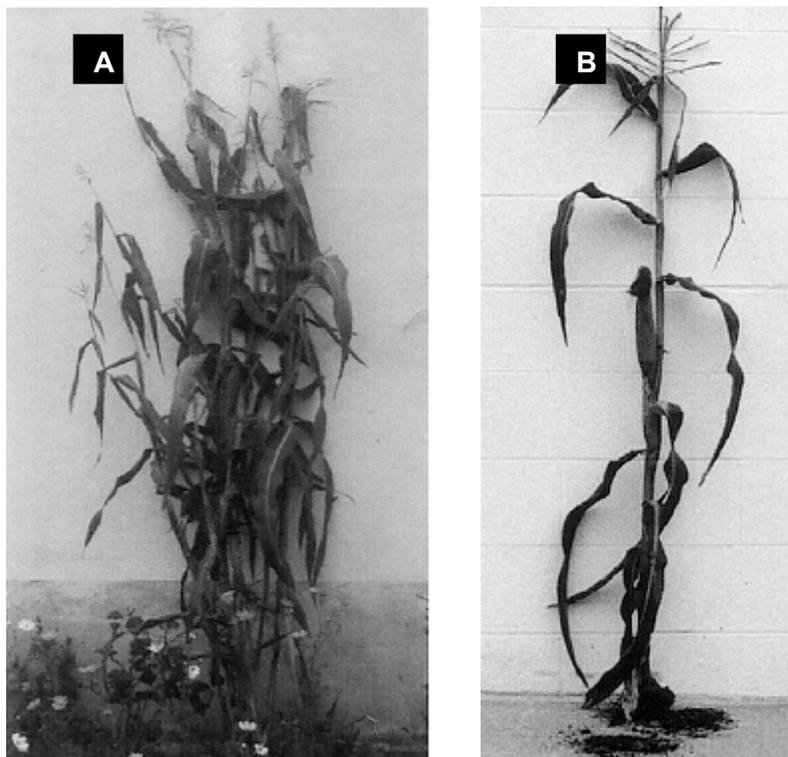


FIGURA 1. Morfologia das plantas de teosinto e de milho. A) (*Zea mays* subsp. *mexicana*) e B) (*Zea mays* subsp. *mays*). Fotos modificadas de White & Doebley (1998).

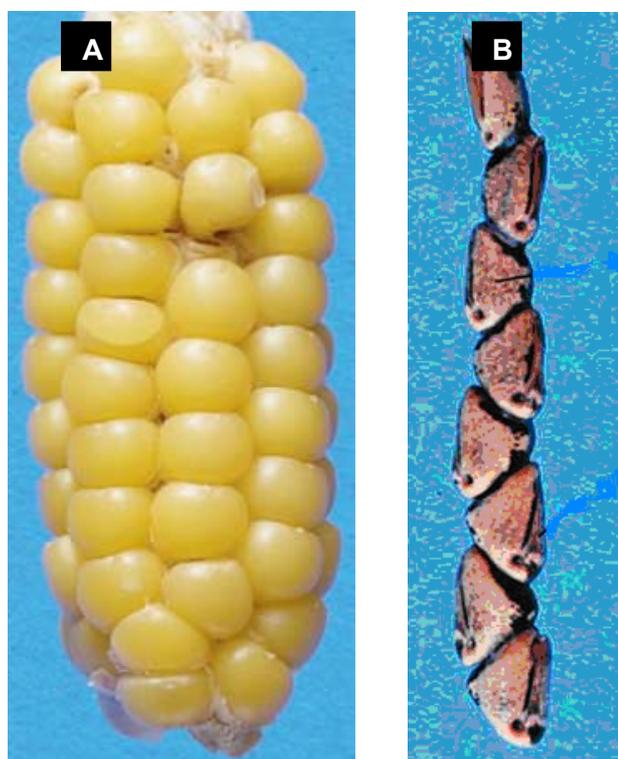


FIGURA 2. Morfologia das inflorescências femininas. A) de milho e B) de teosinto. Fotos modificadas de Wang *et al.* (2005).

## 2.5 Variabilidade genética x melhoramento genético

Segundo Stebbins (1970), a variabilidade genética é fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível haver evolução nas espécies.

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética (entre e dentro) de populações. Esta estrutura resulta da combinação entre mutação, recombinação genética, migração, seleção e deriva genética – as quais definem a distribuição da variabilidade genética nas populações (Cavalli & Winge, 2003).

O milho é, provavelmente, uma das espécies cultivadas que exibe maior variabilidade genética. Essa variação está relacionada a fatores de adaptação ambiental para muitos caracteres, permitindo que o milho seja cultivado em distintas condições ambientais, desde o extremo norte ao extremo sul, de baixas altitudes até altitudes superiores a 2.500 m (Teixeira *et al.*, 2002). A variabilidade genética existente na cultura está organizada em grupos raciais (Brown & Goodman, 1977). Uma raça foi definida como sendo um conjunto de indivíduos que apresentam certas características em comum, as quais permitem seu reconhecimento como um grupo. Em termos genéticos, é caracterizada por apresentar um significativo número de genes em comum (Anderson & Cutler, 1942).

Em milho, muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de detectar variabilidade genética entre diferentes materiais (Smith *et al.*, 1990; Lu & Bernardo, 2001; Gethi *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2005; Reif *et al.*, 2006; Warburton, *et al.*, 2008, entre outros).

Apesar da extensa variabilidade apresentada pelo milho cultivado, espécies relacionadas como o teosinto, são amplamente utilizadas em hibridações artificiais, para fins de melhoramento genético.

Análises moleculares sugerem que um único evento de domesticação (Matsuoka *et al.*, 2002b) resultou em perda de variabilidade genética no milho cultivado (Eyre-Walker *et al.*, 1998; Vigouroux *et al.*, 2002). Embora, no processo “pós-domesticação” o fluxo gênico com o teosinto teria, presumivelmente, elevado a base genética existente no milho (Doebley, 2004), subseqüentemente, a variabilidade foi reduzida por deriva genética e seleção (ambas, artificial e natural) efetuada pelos primeiros agricultores (Reif *et al.*, 2006).

Doebley (1990) apresentou dados isoenzimáticos de que o milho apresenta uma perda de, aproximadamente, 25% da variabilidade genética encontrada em *Z. mays* subsp. *parviglumis*. Sob o ponto de vista do polimorfismo de seqüências de nucleotídeos, os dados foram consistentes com os citados acima. Para locos microsatélites analisados por Vigouroux *et al.* (2005), o milho continha 88% da variabilidade genética encontrada no teosinto e 76% do número de alelos. Outros trabalhos também demonstraram que a perda foi de cerca de 30%, na variabilidade genética do milho (Goloubinoff *et al.*, 1993; Hilton & Gaut, 1998). É nessa variabilidade pertencente ao teosinto – a qual não foi alvo da seleção durante a domesticação do milho – que se podem identificar alelos de interesse agrônômico.

O entendimento da variabilidade disponível é de fundamental importância para minimizar o problema de vulnerabilidade genética, bem como, para reduzir a quantidade de cruzamentos que devem ser realizados nos

programas de melhoramento de milho (Brown & Goodman, 1977). Segundo Paterniani & Campos (1999), para que a condução de um programa de melhoramento genético seja coerente, é necessária a caracterização da variabilidade genética dos diversos tipos de germoplasma. Isto permite ao melhorista a seleção de plantas com características específicas desejadas e descarte de outras (Nodari & Guerra, 2000). O grau de relacionamento genético existente entre materiais constituintes de um programa de melhoramento é outro aspecto fundamental para atingir a máxima eficiência e ganho genético. Para Melchinger *et al.* (1994) o grau de relacionamento genético entre genótipos pode ser estimado através de diferentes métodos, podendo estar baseados em dados de genealogia, caracteres morfológicos e marcadores moleculares ao nível de DNA, entre outros.

A busca por variabilidade genética para fins de melhoramento genético de plantas e em benefício humano continua sendo uma das metas principais dos pesquisadores. Neste sentido, diversas ferramentas podem auxiliar no acesso – direto ou indireto – ao vasto potencial de variabilidade a ser explorado em inúmeros materiais, dentre as quais se destacam as análises fenotípicas, bioquímicas, moleculares e citogenéticas.

### **2.5.1 Marcadores fenotípicos**

A análise de caracteres morfológicos ou fenotípicos tem sido utilizada desde os tempos de Mendel em estudos de genética e para o melhoramento de espécies. A caracterização morfológica consiste na adoção de descritores botânicos herdáveis, facilmente visíveis, mensuráveis e, que em geral, são expressos em todos os ambientes (International Board of Plant Genetics

Resources, 1988). Até meados da década de 60, eram os principais marcadores utilizados e contribuíram significativamente para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Embora muitas características de interesse agrônomo possam servir de marcadores morfológicos, existem algumas limitações na sua utilização. Dentre elas, está o forte efeito de genes determinantes que podem afetar a análise genética de grande número de caracteres. Além disso, poucos caracteres podem ser estudados ao mesmo tempo, devido aos efeitos das interações gênicas e também das interações com o ambiente, que podem modificar a expressão dos caracteres utilizados como marcadores (Weeden *et al.*, 1994; Bered *et al.*, 1997).

A caracterização morfológica com o objetivo de avaliar caracteres de interesse agrônomo e determinar a distância genética entre genótipos vem sendo empregada há muito tempo no melhoramento do milho.

Melo *et al.* (2001) estimaram a divergência genética entre híbridos comerciais de milho, através da análise de 25 caracteres morfológicos e do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso, Williams *et al.*, 1990). Os autores observaram que ambos os marcadores foram capazes de discriminar os genótipos, embora encontrassem baixa correlação entre eles, concluindo que os dois tipos de marcadores são distintos, mas complementares.

Andrade *et al.* (2002) caracterizaram e avaliaram coleções de genótipos de milho armazenados no Banco Ativo de Germoplasma da EMBRAPA Milho e Sorgo (Sete Lagoas/ MG). Os autores obtiveram grande variabilidade fenotípica para todos os caracteres estudados e os resultados obtidos permitiram a

seleção de acessos para melhoramento genético. Teixeira *et al.* (2002) e Netto *et al.* (2002) encontraram resultados semelhantes.

A avaliação da divergência genética também tem sido utilizada e, com sucesso, na estimativa do relacionamento entre genótipos de milho, auxiliando na classificação de raças e populações (Goodman *et al.*, 1978; Camussi, 1979). Além do que esta metodologia pode servir como uma ferramenta adicional na escolha dos genitores, para a obtenção das melhores combinações (Melo *et al.*, 2001a; Netto *et al.*, 2002). Dessa forma, é necessário salientar alguns trabalhos relacionados a essas investigações, evidenciando a importância do teosinto como recurso genético para programas de melhoramento de milho.

Sohoo *et al.* (1993) identificou genes de resistência a broca de milho e menor suscetibilidade a mancha da folha causada por *Curvularia trifolii* e *Pyricularia* spp em genótipos de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*). Esta variedade também produziu 26 % mais de matéria seca e 14,9 % mais grãos, quando comparada a genótipos de milho.

Segundo Swarup *et al.* (1995), alguns caracteres agrônômicos importantes não foram selecionados pelo homem durante o processo de domesticação do milho. Os autores demonstraram que genes para alto conteúdo de metionina não foram selecionados do teosinto e poderiam ser aproveitados para melhoramento genético dessa cultura.

Zhou *et al.* (1997) desenvolveram 14 linhagens após seleção de um cruzamento entre milho e teosinto e oito gerações de autofecundação. As linhas foram identificadas como resistentes a moléstias, insetos e a estresses ambientais. Os híbridos de milho x teosinto mostraram forte heterose,

indicando a potencialidade de hibridização entre milho e teosinto para ampliar o germoplasma de milho.

Por fim, a variabilidade fenotípica observada em muitas características pode ser devida a variações no genótipo, variações no efeito do ambiente e na resposta diferencial de alguns genótipos ao ambiente (Federizzi, 1998). Além do que o número reduzido de variantes fenotípicas pode resultar na classificação de homogeneidade genética de populações (Futuyma, 1992), embora isso muitas vezes não expresse a realidade. As limitações inerentes a utilização dos descritores morfológicos gerou a necessidade de se encontrar novas alternativas e estratégias, como os descritores bioquímicos (isoenzimas) e de proteínas e, mais recentemente os de DNA, principalmente pelo seu potencial de discriminação de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados (Milach, 1998).

### **2.5.2 Marcadores bioquímicos**

O controle genético da síntese de proteínas torna possível a existência de diferenças estruturais de enzimas homólogas ou proteínas sintetizadas por espécies distintas, ou até mesmo por genótipos diferentes dentro da mesma espécie. O fato surpreendente é que diversas enzimas não só existam em múltiplas formas dentro de um único organismo, como dentro de um único tecido (Weeden & Wendel, 1990).

As isoenzimas podem ser definidas por um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorrem em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (Moss, 1982 citado por Ferreira & Grattapaglia, 1998). Sendo que o termo

“isoenzimas” somente foi adotado após sugestão do *Standing Committee on Enzyme of International Union of Biochemistry* (Webb, 1965 *apud* Oliveira, 1976), anteriormente, eram denominadas por isozimas. A base desta técnica está na associação de métodos de separação de proteínas: eletroforese em gel (Smithies, 1955) e metodologias de coloração histoquímica para produtos enzimáticos. A detecção envolve, basicamente, três etapas: a extração de proteínas do tecido vegetal, a separação destas proteínas através de eletroforese em gel (de amido ou poliacrilamida) e a coloração histoquímica do gel, o que permite a visualização do produto da reação enzimática – expressa na forma de bandas de atividade (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Desde sua descoberta, no final da década de 50, até o presente momento, o uso das isoenzimas se difundiu através do desenvolvimento de métodos eficientes de visualização dos produtos enzimáticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998), da identificação de enzimas com formas múltiplas em diferentes táxons e sistemas enzimáticos (Stebbins, 1990), bem como por ter sido comprovada sua aplicabilidade em estudos de diversas áreas da biologia vegetal.

Por várias décadas, as isoenzimas foram os marcadores bioquímicos mais utilizados em análises genéticas e no melhoramento vegetal (Cavalli, 2003). Isoenzimas possuem muitas características que as tornam úteis como marcadores genéticos para estudos da variabilidade existente em populações vegetais. Uma das características mais importantes é a sua expressão codominante, onde os genótipos homozigotos e heterozigotos podem ser distinguidos. Além da especificidade enzimática, a qual permite a atribuição de

alelos a locos diferentes e comparações destes locos em diferentes populações e/ ou espécies (Brown & Weir, 1983; Ballve *et al.*, 1995).

Por serem proteínas, as isoenzimas são produtos, quase direto, de genes estruturais. Alterações nas seqüências de DNA resultam em modificações na composição de aminoácidos. Estas mudanças – por substituição ou conformação – se manifestam através de diferentes mobilidades eletroforéticas (Brown & Weir, 1983; Weeden & Wendel, 1990). De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), essa é a premissa básica adotada ao se utilizar o polimorfismo gerado por proteínas – diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças em seqüências do DNA que codificam tais enzimas.

Segundo Alfenas *et al.* (1991), a expressão das isoenzimas nos géis constitui o polimorfismo genético através de um conjunto de bandas com intensidade e mobilidade específicas.

Dentre as inúmeras vantagens dos marcadores isoenzimáticos estão: importante informação genética para diversas aplicações, a relativa simplicidade, baixo custo e rapidez na análise de vários locos simultaneamente. No entanto, quando a investigação requer uma cobertura mais ampla do genoma, as isoenzimas apresentam limitações, como por exemplo, o número limitado de sistemas polimórficos que pode ser visualizado em cada espécie, ausência de polimorfismo para determinados locos, especificidade de formas enzimáticas por alguns tecidos vegetais, polimorfismo em resposta a condições ambientais ou associado a estádios do desenvolvimento da planta, entre outras (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica pode ser utilizada para a quantificação de variabilidade genética e para análise da estrutura genética de populações (Jasieniuk & Maxwell, 2001), entre outras finalidades.

Desde o advento da eletroforese de proteínas (por volta de 1960), marcadores isoenzimáticos têm sido extensivamente usados para acessar a variabilidade genética entre e dentro de populações vegetais (Dubreuil & Charcosset, 1998). Para espécies vegetais de importância agrônômica, como o milho, a estimativa da variabilidade genética através da utilização das isoenzimas, tem sido objeto de interesse para muitos pesquisadores (Doebley *et al.*, 1983, 1984; Doebley *et al.*, 1988; Sanchez *et al.*, 2000). Foi através de análises isoenzimáticas que Doebley *et al.* (1987) indicaram *Zea mays* subsp. *parviglumis* como o ancestral mais próximo do milho, apoiando a teoria de que o milho foi domesticado a partir do teosinto.

#### **2.5.2.1 Sistema das esterases (EST – EC. 3.1.1.1)**

Segundo revisão de Scandalios (1969), os primeiros estudos de isoenzimas em plantas foram realizados por Schawartz (1960), com esterases, em milho. O autor observou a existência de diferentes isoenzimas de esterase, controladas por três locos. O mesmo autor, em 1965, identificou a estrutura funcional destas isoenzimas como dimérica, devido à ocorrência de heterozigotos, quando efetuados cruzamentos de indivíduos com padrões isoenzimáticos distintos.

As esterases fazem parte de um grupo complexo e heterogêneo de enzimas (Scandalios, 1969). Conforme *International of Biochemistry* (IUPAC) 1979, as esterases são hidrolases que atuam nas ligações ésteres e estão

divididas em sete subgrupos, de acordo com substrato sobre o qual atuam. O polimorfismo apresentado por esta enzima é devido à especificidade por múltiplos substratos e por pertencerem ao metabolismo periférico, o qual possui ampla variabilidade genética (Gillespie & Langley, 1974).

As esterases têm sido amplamente estudadas, estando entre as enzimas com maior polimorfismo observado. Geralmente, em plantas, apresentam estrutura funcional monomérica e/ ou dimérica, com duas a dez isoenzimas (Weeden & Wendel, 1990).

Na década de 80, muitas pesquisas direcionaram seu interesse para as análises isoenzimáticas da diversidade genética existente no milho. Neste contexto, Heidrich-Sobrinho (1982) realizou a identificação de nove linhagens de milho, utilizando quatro locos de esterase. Estes locos apresentaram de duas a quatro isoenzimas associadas. O mesmo autor já havia observado 11 locos atuando no controle de 26 isoenzimas de esterase em milho.

Recentemente, Sanchez *et al.* (2006), para determinar a variabilidade genética e o relacionamento entre raças de milho dos Andes, utilizaram diferentes sistemas enzimáticos, entre eles o sistema das esterases. Os mesmos autores (Sanchez *et al.*, 2007) analisaram a variação das esterases e outras enzimas entre as raças brasileiras de milho – relacionando os dados obtidos com as isoenzimas a dados geográfico-taxonômicos e morfológicos – para determinar o nível relativo de diversidade genética existente na região.

A aplicação desta técnica para caracterização genética de populações, aliada aos dados obtidos com marcadores morfológicos e, atualmente, aos dados moleculares, contribui para obtenção de informações valiosas sobre germoplasmas de interesse ao melhoramento genético, bem como para

estabelecer o relacionamento filogenético entre táxons aparentados, entre outras finalidades.

Sendo assim, as análises de padrões de esterase em milho têm apresentado amplo polimorfismo e alta estabilidade e podem contribuir para a caracterização da variabilidade existente nas populações de teosinto utilizadas neste estudo.

### **2.5.3 Marcadores moleculares**

Diversas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar a diversidade genética existente nas diferentes espécies. O emprego de marcadores moleculares, por exemplo, permite a obtenção de um número ilimitado de marcadores cobrindo todo o genoma do organismo e podem ser utilizados com diversos objetivos. O uso de marcadores moleculares tem contribuído muito na exploração das variações genéticas para inferir sobre a história evolutiva e auxiliar no planejamento dos programas de melhoramento de milho (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A caracterização genética, através da utilização de marcadores moleculares, possibilita a estimativa de vários índices genéticos e o conhecimento da organização da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações (Nodari & Guerra, 2000). Diversos trabalhos seguem nessa linha de estimativa da variação genética em populações a partir de marcadores moleculares (Bered *et al.*, 2002; Amorim *et al.*, 2003; Vieira, 2004; Oliveira *et al.*, 2007).

Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular surgiram vários métodos de detecção de polimorfismo genético em nível de DNA.

Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição e hibridização de seqüências de DNA permitiu a análise de RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism* ou Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição). O desenvolvimento do PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação da Polimerase em Cadeia, ou seja, processo de amplificação em cadeia do DNA, utilizando a enzima DNA polimerase), em meados da década de 80, possibilitou o desenvolvimento de outras classes de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1998). São elas: o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), o AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), os SSR (*Simple Sequence Repeats* ou Seqüências Simples Repetidas: microssatélites), entre outras (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Melo *et al.*, 2001; Benchimol *et al.*, 2001).

Maluf *et al.* (2005) utilizaram três tipos de marcadores (RAPD, AFLP e SSR) para a caracterização da variabilidade genética de linhagens comerciais de *Coffea arabica* L. e sugeriram que a utilização conjunta de descritores botânicos, agronômicos e marcadores moleculares poderia ser recomendada para a identificação precisa de linhagens.

No milho encontrou-se forte associação entre a divergência genética obtida por marcadores moleculares e a obtida a partir de caracteres agronômicos, sendo que a utilização complementar de ambas não exclui a funcionalidade de nenhuma, ao contrário maximiza sua eficiência (Melo *et al.*, 2001). Em estudo similar, Benchimol *et al.* (2001) constataram que o conteúdo de informação de polimorfismo é superior em marcadores codominantes (RFLP e SSR) do que em dominantes (RAPD e AFLP), ao compararem o poder de

quatro tipos de marcadores moleculares (RFLP, RAPD, AFLP e SSR) em linhagens de milho.

Portanto, a utilização dos marcadores moleculares vai muito além dos estudos de caracterização da variabilidade genética. Eles permitem a análise da divergência genética entre genótipos, avaliações de diferentes grupos taxonômicos em nível de DNA – principalmente dentre os cereais (Keller & Feuillet, 2000), bem como a quantificação da variabilidade genética, correlacionando-a com caracteres fenotípicos no mapeamento de caracteres de importância agrônômica (Beavis *et al.*, 1991; Stuber *et al.*, 1987; Edwards *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1993; Beavis *et al.*, 1994; Veldboom *et al.*, 1994; Tadmor *et al.*, 1995), entre outras finalidades.

### **2.5.3.1 Microssatélites (SSR)**

Os microssatélites (SSR – “*Simple Sequence Repeats*”) são seqüências curtas com um a seis nucleotídeos repetidos lado a lado, ao longo da molécula de DNA, as quais são flanqueadas por seqüências conservadas. Cada ilha de microssatélites constitui um loco genético altamente variável, com um elevado conteúdo de informação de polimorfismo (*PIC: Polymorphism Information Content*) e apresenta estabilidade ao longo das gerações (Taramino & Tingey, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Sharopova *et al.*, 2000; Padilha *et al.*, 2002). Este tipo de marcador utiliza iniciadores (*primers*) específicos que amplificam regiões de DNA repetitivo (Milach, 1998).

Em plantas, os sítios microssatélites são largamente distribuídos com uma freqüência de um a cada 50 mil pares de bases, sendo o elemento mais comum o di-nucleotídeo AT. As regiões contendo as seqüências simples

repetidas são amplificadas através da PCR (*Polimerase Chain Reaction* ou reação da polimerase em cadeia), utilizando-se um par de iniciadores específicos (de 20 a 30 pares de bases) e complementares às seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo do mesmo loco. A detecção das seqüências microssatélites via PCR, é feita em gel de eletroforese utilizando-se poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente, por coloração com brometo de etídeo ou nitrato de prata ou ainda, através de auto-radiografia, utilizando iniciadores marcados com radioisótopos na reação de PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores do tipo microssatélites têm se revelado eficientes na diferenciação e agrupamento de linhagens de milho, na análise de sintenia e mapeamento de caracteres de importância agrônômica (Smith & Smith, 1988; Smith *et al.*, 1990; Beavis *et al.*, 1991). Quando comparado a outros sistemas que utilizam PCR, como por exemplo, o RAPD, os SSR apresentam algumas vantagens. A técnica apresenta alta reprodutibilidade, e tem a capacidade de distinguir vários alelos para o mesmo loco (multialelismo), fazendo com que esse tipo de marcador seja ideal para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Segundo Senior (1993), os microssatélites constituem uma importante ferramenta em estudos genéticos no milho. Além disso, existem inúmeras seqüências de pares de iniciadores (*primers*) – que flanqueiam locos microssatélites de milho – disponíveis na Base de Dados do Genoma do Milho (*Maize Genome Database*: [www.agron.missouri.edu/ssr.html](http://www.agron.missouri.edu/ssr.html)).

Lübberstedt *et al.* (1998) indicaram que os SSR possuem muitas características desejáveis, como um modo de herança codominante (capacidade de identificar heterozigotos), serem abundantes nos genomas de plantas, o multialelismo, o baixo custo e o potencial de se utilizar reações multiplex.

Taramino & Tingey (1995) ao compararem marcadores RFLP e SSR, concluíram que os microssatélites são mais informativos que os marcadores RFLP, possibilitando sua utilização em análises de espécies altamente polimórficas, como o milho. Semelhante a conclusão efetuada por Pejic *et al.* (1998), que afirmaram que locos microssatélites são marcadores codominantes mais informativos do que o RAPD e o RFLP.

Analisando a evolução dos locos microssatélites, 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 milho, diversos estudos têm demonstrado a eficácia dos marcadores microssatélites na caracterização da variabilidade genética entre genótipos ou grupos para fins de melhoramento. Dentre eles estão Liu *et al.* (2003), em linhagens do CIMMYT (International Center for the Improvement of Maize and Wheat) e IITA (International Institute of Tropical Agriculture); Reif *et al.* (2003) e Reif *et al.* (2004), em populações tropicais; Reif *et al.* (2005), em variedades européias de polinização aberta; Laborda *et al.* (2005), em linhagens tropicais;

Reif *et al.* (2006), em acessos mexicanos; Wang *et al.* (2008), em linhagens recombinantes provenientes do cruzamento entre uma linhagem temperada e uma linhagem tropical de milho, entre outros.

Nesta linha de pesquisa, Gethi *et al.* (2002) analisaram a variabilidade genética existente entre e dentro de linhagens de milho de diferentes origens, usando marcadores moleculares microssatélites. Amorin *et al.* (2003) utilizaram uma análise conjunta com marcadores morfológicos e moleculares (RAPD e SSR) para estimar a variabilidade genética em genótipos de milho doce. Similarmente, Wiethölter *et al.* (2008) caracterizaram a variabilidade genética existente em variedades crioulas de milho provenientes do sul do Brasil, através de análises moleculares e fenotípicas.

Outra aplicação dos microssatélites é a análise da divergência genética, com a qual é possível identificar os genitores mais distantes, objetivando maximizar a heterose, após o cruzamento. Segundo Laborda *et al.* (2001), marcadores microssatélites possuem grande aplicabilidade para esse fim, devido ao multialelismo, à distribuição randômica e dispersão pelo genoma, bem como, ao padrão de herança codominante. Esses pesquisadores ressaltaram ainda que, com base em valores de divergência genética, é possível avaliar diversos genótipos e prever os melhores cruzamentos, reduzindo drasticamente esforços e custos em programas de melhoramento genético.

Estudos evolutivos foram desenvolvidos por diversos autores na elucidação do relacionamento genético no gênero *Zea*, através da utilização dos locos microssatélites. O emprego de marcadores microssatélites em estudos populacionais tem demonstrado um alto potencial para utilização em

espécies altamente polimórficas como o milho, bem como em materiais com estreito relacionamento genético.

Lübberstedt *et al.* (1998) realizaram um estudo onde locos microssatélites de milho foram utilizados em teosinto, objetivando verificar seu potencial para exploração deste recurso genético. Eles demonstraram que os microssatélites são marcadores úteis na detecção da variabilidade genética em genótipos relacionados.

Matsuoka *et al.* (2002a) avaliaram o desempenho dos microssatélites para estudos evolutivos entre milho e teosinto. As análises revelaram que os microssatélites são marcadores filogenéticos poderosos para reconstruir o relacionamento, inter e intra-específicos, de populações de *Zea*.

Vigouroux *et al.* (2005) analisaram a variabilidade apresentada por marcadores microssatélites no genoma do milho e compararam a variação existente nestes locos, com a que foi observada no teosinto, visando definir as forças evolutivas que atuaram na domesticação do milho cultivado.

Na era das novas biotecnologias, os marcadores moleculares do tipo microssatélites validaram sua importância para estudos genéticos e evolutivos, bem como para auxiliar a definição de estratégias para o melhoramento genético do milho. No entanto, as tecnologias celulares, como por exemplo, técnicas citogenéticas, ainda apresentam importância expressiva e numerosas aplicações dentro do segmento científico.

## **2.6 Citogenética**

### **2.6.1 Considerações gerais**

A literatura clássica sobre a junção dos conhecimentos das áreas da genética com a citologia, denominada citogenética, é definida como a correlação da genética com as características cromossômicas. A citogenética pode ainda ser definida como a disciplina que diz respeito às implicações genéticas da estrutura dos cromossomos e seu comportamento. Como ciência, estuda qualquer comportamento relativo aos cromossomos, bem como, suas variações e evolução durante a transmissão ou meiose (Gill & Friebe, 1998). Singh (1993) considera a citogenética como a ciência que combina a análise dos cromossomos, função e movimento, número e estrutura, bem como modificações da estrutura e comportamento e, como estão relacionados à recombinação, transmissão e expressão dos genes. Segundo Guerra (1988), estudos citogenéticos compreendem todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação, bem como na sua variação e evolução.

Os estudos citogenéticos possibilitam a obtenção de informações para caracterização citológica e permitem que diferenças possam ser encontradas entre as espécies. Essas informações são fundamentais para estudos evolutivos, de relação filogenética e de polimorfismos intra e interespecíficos (Pozzobon, 2005). Para Lacadena (1996), a citogenética tem como objetivos principais analisar e explicar como a estrutura e o comportamento dos cromossomos garantem a tripla função de, conservar a informação genética entre as células de um organismo pluricelular, transmiti-la de pais para filhos e

liberá-la de forma ordenada para controlar as funções celulares e o desenvolvimento do organismo.

A citogenética também possui um papel importante em estudos evolutivos e taxonômicos, uma vez que auxilia nos problemas de classificação e identificação taxonômica, além de melhorar a compreensão evolutiva dos grupos (Stace, 2000). Nessa linha, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para esclarecer questões relacionadas à taxonomia, origem e evolução das espécies vegetais (Almeida, 2003; Terra, 2004; Conterato & Schifino-Wittmann, 2006; Pozzobon *et al.*, 2006), entre outras finalidades igualmente relevantes.

Mesmo com o advento das técnicas moleculares atuando no mapeamento e seqüenciamento dos genomas, o uso de análises citogenéticas se mantém relevante e de suma importância por diversas razões. Em primeiro lugar, devido à citogenética ser parte integrante de projetos que envolvem mapeamento. Em segundo, nas fases de mitose e meiose, os cromossomos podem indicar anomalias, viabilidade dos grãos de pólen, proximidade taxonômica entre espécies, entre outras informações (Gill & Friebe, 1998).

### **2.6.2 Citogenética x melhoramento genético**

A citogenética se desenvolveu, principalmente, a partir do século passado e seu progresso foi permitido através do surgimento das técnicas e equipamentos para microscopia. Na área vegetal, apresentou um grande avanço na década de 30 (Moraes-Fernandes, 1982) e, desde então, essa ciência vem fornecendo valiosa contribuição para resolução de muitos

problemas de evolução e dos programas de melhoramento de plantas cultivadas (Aguiar-Perecin, 1987).

A citogenética possui duas importantes funções para o melhoramento genético de plantas: gerar informações e fornecer métodos para a manipulação genética (Sybenga, 1998). Os métodos de manipulação relacionados a técnicas citogenéticas já permitiram a transferência de genes ou blocos gênicos (intra ou interespecíficos) que controlam diversas características de importância agrônômica. Para tanto, a caracterização de germoplasma é etapa essencial para fins de melhoramento genético, entre outras finalidades. Uma vez que, o germoplasma representa todo o conjunto genético de uma espécie que pode servir como fonte de variabilidade genética a ser utilizada pelos melhoristas (Miglani, 1998).

A engenharia cromossômica é uma importante ferramenta para aplicação no melhoramento genético de plantas, o qual continua promovendo impactos significantes na produção agrícola (Gill & Friebe, 1998). Através dessa análise, é possível determinar o número e o comportamento dos cromossomos, os níveis de ploidia, a fertilidade dos grãos de pólen, entre outros, auxiliando na identificação e escolha de materiais para serem utilizados em cruzamentos dirigidos em programas de melhoramento genético (Sybenga, 1993, 1998; Pagliarini & Pozzobon, 2004). Dessa forma, a viabilidade dos cruzamentos interespecíficos pode ser eficientemente verificada. Neste contexto, Defani-Scoarize *et al.* (1996) publicaram um estudo que demonstra o valor da estabilidade meiótica em linhagens para o processo de produção dos híbridos em programas de melhoramento e que a mesma depende do comportamento das combinações utilizadas, entre outros fatores.

Nas análises da meiose de células mãe de pólen – as quais fornecem informações importantes sobre a estabilidade de cruzamentos interespecíficos – podem ser observadas possíveis anomalias na formação dos gametas masculinos e femininos que poderão originar novas plantas.

Love (1949) avaliou o índice meiótico – o qual representa a porcentagem de quartetos de pólen normais – em cultivares de trigo do Rio Grande do Sul e observou diversas anormalidades capazes de explicar o insucesso obtido em alguns cruzamentos. O índice meiótico pode ser aplicado às análises dos grãos de pólen, indicando irregularidades ocorridas na meiose.

Para Stebbins (1951), distúrbios citológicos representam um dos principais fatores condicionantes de esterilidade em plantas. Sendo assim, o estudo dos grãos de pólen (viabilidade, forma, tamanho e germinação) pode contribuir para a determinação da fertilidade masculina de variedades de milho. As informações geradas nestes estudos são de grande interesse e indispensáveis ao melhoramento genético, pois indica o potencial reprodutivo das plantas.

A importância da análise da divisão meiótica está no fato de envolver uma série de fenômenos mecânicos e bioquímicos de considerável complexidade que se associam em relação à redução do número cromossômico.

A efetividade do pareamento meiótico dos cromossomos depende fundamentalmente da similaridade estrutural e química entre os mesmos, conhecida como homologia. O pareamento dos cromossomos e a segregação mendeliana dos genes podem ser afetados pela divergência estrutural entre os cromossomos, bem como pelo ambiente celular que predominar na meiose.

Esse último pode ser afetado pelo ambiente externo (temperatura e disponibilidade hídrica) ou por genes que controlam mecanismos moleculares requeridos na meiose (Singh, 1993). Foi através de análises citogenéticas realizada em coleções de *Coix* spp., *Zea mays* e teosinto (*Zea* spp), que Katiyar & Sachan (1992) demonstraram a similaridade morfológica existente entre os cromossomos de teosinto com os do milho, excluindo características cariomorfológicas comuns entre os genomas de *Coix* e *Zea*.

Poggio *et al.* (1997), analisando o comportamento meiótico e o conteúdo de DNA em linhas aloplásmicas de milho, observaram que, ao combinar genótipos de milho com teosinto (*Zea mays* sbsp. *mexicana*), vários caracteres herdáveis são afetados – modificando a estrutura e a função genômica de alguns genótipos de milho.

Almeida (2003) encontrou alta estabilidade meiótica em genótipos oriundos de hibridações entre milho comum, milho doce e teosinto. Demonstrando que os híbridos apresentaram algumas anormalidades em determinadas fases da meiose, sem, entretanto, reduzir a formação de tétrades e a viabilidade dos grãos de pólen.

A viabilidade dos grãos de pólen, apesar de ser geneticamente determinada, pode sofrer influência de diversos fatores, como o uso de agrotóxicos (Sereno *et al.*, 1981; Smith & Moser, 1985; Sari-Gorla, 1994), variações de temperatura e umidade (Bodanese-Zanettini *et al.*, 1979; Rodriguez-Garay & Barrow, 1988), concentrações salinas do solo (Hormaza & Herrero, 1992), entre outros fatores, os quais induzem mudanças significativas na resposta do pólen.

Enfim, a análise da viabilidade dos grãos de pólen é uma importante estratégia utilizada em estudos que visam avaliar o potencial de fertilidade em diferentes materiais, bem como é uma indicação de estabilidade nas hibridações interespecíficas, de interesse para o melhoramento genético.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em populações de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) e linhagens de milho (*Zea mays* subsp. *mays*), bem como em gerações oriundas de cruzamentos entre as duas subespécies (F<sub>1</sub>s e de retrocruzamentos: RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>s e RC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>s). Os estudos incluíram investigações da variabilidade genética nas populações de teosinto e análises de cruzamentos dirigidos entre milho e teosinto. As análises da variabilidade genética foram realizadas nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura e no Laboratório de Citogenética Vegetal e Eletroforese do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, ambos localizados na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS). As avaliações em campo experimental foram efetuadas na Estação Experimental Agrônômica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS), na sede da EMBRAPA – Clima Temperado (Pelotas, RS) e na Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS). O laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS foi utilizado para a avaliação da viabilidade dos grãos de pólen. O germoplasma utilizado no projeto foi recomendado pelo Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva e cedido pela EMBRAPA – Clima Temperado. Neste trabalho foram utilizadas

três linhagens de milho do programa de melhoramento para tolerância ao encharcamento da EMBRAPA. Estas linhagens foram selecionadas por apresentarem comportamento diferenciado quanto à tolerância ao encharcamento do solo, sendo 672733 (P2) uma linhagem resistente ao encharcamento, 672736 (P5) uma linhagem suscetível e 672739 (P6) uma linhagem moderadamente suscetível ao encharcamento. Os procedimentos adotados estão detalhadamente caracterizados abaixo.

### **3.1 Estimativas da variabilidade genética**

A variabilidade genética foi analisada em duas populações de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*), determinadas conforme a sua localização de origem (Canguçu e Monte Bonito). Esses materiais foram submetidos a análises fenotípicas, bioquímicas e moleculares.

#### **3.1.1 Análises fenotípicas**

Os experimentos para a avaliação dos caracteres agrônômicos foram instalados a campo, em Eldorado do Sul (EEA-UFRGS) e em Pelotas (EMBRAPA – Clima Temperado), entre outubro de 2006 e março de 2007. Foram utilizadas linhas de cinco metros, com espaçamento de 70 cm entre linhas, 30 cm entre plantas e delineamento completamente casualizado. A semeadura foi realizada com auxílio de plantadeiras manuais, utilizando três sementes por cova. Em torno de 20 dias após a semeadura, foi realizado o desbaste mantendo apenas uma planta por cova. No estágio de quatro a oito folhas por planta foi realizada a aplicação de uréia, estimando-se 100 kg de nitrogênio (N<sub>2</sub>) por hectare.

Foram analisadas 48 plantas das populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e em cada local, totalizando 96 plantas avaliadas. Além de três populações utilizadas como testemunhas. As testemunhas foram constituídas por três linhagens de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), sendo que 16 plantas foram analisadas na EEA-UFRGS e 24 plantas na EMBRAPA – Clima Temperado, totalizando 40 plantas. Cabe adicionar que, para realização das medidas nas populações de teosinto, foi tomado por referência o colmo principal.

Foram mensuradas as seguintes características fenotípicas:

EST: estatura de planta (cm) – média da altura da planta do solo até a folha bandeira;

INSE: altura de inserção da espiga (cm) – média da altura das espigas do solo até a inserção da primeira espiga;

CI: comprimento do internódio (cm) – média do comprimento do internódio abaixo da primeira espiga;

NI: número de internódios por planta – média do número de internódios do solo até o pendão;

NFACE: número de folhas acima da espiga – média do número de folhas acima da primeira espiga até o pendão;

NFABE: número de folhas abaixo da espiga – média do número de folhas abaixo da primeira espiga até o solo;

CFIE: comprimento da folha de inserção da espiga (cm) – média do comprimento da folha de inserção da primeira espiga, tomado da bainha até a ponta da folha;

LFIE: largura da folha de inserção da espiga (cm) – média da largura da folha de inserção da primeira espiga, tomada no meio da folha;

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo método Tukey-Kramer, o qual utiliza médias ajustadas pelo LSMeans – no caso de interações significativas. Estas análises foram realizadas no programa SAS (SAS Institute, 1999). Para verificar o agrupamento dos indivíduos de cada população de teosinto e compará-los as testemunhas (linhagens de milho P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), foi calculada a distância genética entre eles (Distância Euclidiana), utilizando o programa NTSYSpc versão 2.10m (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* ou taxonomia numérica e sistema de análise multivariada – Rohlf, 2000). A matriz dos dados foi utilizada para a construção de um dendograma.

### **3.1.2 Análises bioquímicas**

O experimento foi desenvolvido entre agosto e outubro de 2008, no Laboratório de Citogenética Vegetal e Eletroforese do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Foi utilizado o sistema enzimático das esterases para caracterizar as populações, onde foram analisados padrões de alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) esterase. As análises foram desenvolvidas em duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e duas linhagens de milho (P2: 672733 e P5: 672736), sendo que as linhagens foram utilizadas como testemunhas. Foram analisados 29 indivíduos da população Canguçu, 21 da Monte Bonito e sete indivíduos de cada linhagem.

### **3.1.2.1 Germinação do material**

A germinação das sementes foi efetuada no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura, na Faculdade de Agronomia da UFRGS (Porto Alegre, RS).

O material foi semeado em copos plásticos de 200 ml, previamente preenchidos com substrato esterilizado (Apêndice 1). O processo de esterilização constou em submeter o substrato a uma temperatura de 120 °C (em autoclave), por 60 minutos. Esse procedimento visa reduzir contaminação do substrato por fungos pré-existentes. Logo após a esterilização, o substrato foi enriquecido com uréia, seguindo a estimativa de 100 kg de nitrogênio (N<sub>2</sub>) por hectare.

Foi disposta uma semente individual em cada copo plástico. Os copos foram acondicionados em bandejas plásticas de, aproximadamente, 65 x 45 x 9 cm (Figura 3). As bandejas foram mantidas em sala de crescimento, com controle de temperatura (25 °C) e sob lâmpadas fluorescentes (mantidas ligadas 24 horas). O material foi acompanhado diariamente para que fosse possível manter a umidade do substrato contido nos copos. Em geral, as sementes iniciaram sua germinação quatro dias após a serem semeadas e a coleta do tecido foliar foi realizada após a emissão da terceira folha (anteriormente a emissão da quarta folha).

Para a realização das análises isoenzimáticas foi utilizado o tecido da terceira folha inteira e foram realizadas quatro repetições do experimento.



FIGURA 3. Germinação de sementes de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) em sala de crescimento. A) dois dias após a semeadura B) 15 dias após a semeadura. Fotos: Terra, T. F. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008

### 3.1.2.2 Eletroforese de isoenzimas

As amostras foram obtidas de extratos foliares coletados no momento da realização da técnica e todo o processo de extração foi efetuado sobre gelo. Foram utilizados componentes químicos (Apêndice 2) associados à solução de extração, que auxiliam na prevenção do processo de oxidação de compostos fenólicos existentes nos vegetais. A temperatura do ambiente foi também controlada e mantida em torno dos 18 °C, visto que o calor e/ou a oxidação dos extratos vegetais podem causar a desnaturação das proteínas, modificando a sua mobilidade e atividade enzimática

Amostras de folíolos jovens foram coletadas, submetidas à extração de isoenzimas individualmente e, posteriormente, sua separação foi efetuada por eletroforese horizontal.

### 3.1.2.3 Extração de proteínas

Os extratos foliares coletados foram picados com tesoura e colocados em placas de vidro com pequenas cavidades (em torno de cinco centímetros de diâmetro), onde foram adicionadas 100 µl da solução de extração de Collins

et al. (1984) modificada (Apêndice 2). A solução de extração foi previamente preparada e mantida a 4 °C, até a maceração dos tecidos. Os tecidos foliares foram macerados com o auxílio de um bastão de vidro até a obtenção de um líquido homogêneo. Durante a realização desse procedimento, as placas foram mantidas sobre gelo, visando manter a integridade das proteínas. Sob o líquido macerado foram mergulhados papéis cromatográficos (nas dimensões de 1 x 4 mm), possibilitando a absorção da solução para, posteriormente, serem aplicados nas cavidades dos géis.

#### **3.1.2.4 Preparo dos géis de poliacrilamida**

Foram utilizados géis de poliacrilamida a uma concentração de 10%. Para confecção dos géis, uma solução estoque (Apêndice 3) foi preparada anteriormente e mantida a 4 °C, até a utilização para eletroforese de isoenzimas.

No preparo de cada gel individual, uma alíquota de 70 ml da solução estoque foi reservada em uma proveta, onde foram acrescentados 700 µl de persulfato de amônio (APS: solução a 10%). A solução estoque foi composta de uma solução de acrilamida e bis-acrilamida (50 ml), de N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamina (TEMED – 0,2 ml), além de dois tipos de tampão: A e B, na proporção de nove partes da solução B (18 ml) e uma parte da solução A(2 ml), conforme protocolo de Scandalios (1969). Nas cubas eletrolíticas foi utilizada a solução tampão A

A solução foi vertida em um suporte de vidro com dimensões de 210 x 180 x 1 mm, o qual foi coberto por uma placa de vidro com dimensões iguais e, previamente umedecida com óleo mineral, para evitar a adesão do gel. Esta

etapa foi realizada com cuidado, evitando a formação de bolhas de ar entre o suporte e a placa de vidro enquanto o gel polimerizava.

O processo de polimerização dos géis ocorreu na ausência de ar e em temperatura ambiente. Em geral, os géis permaneceram cerca de 30 minutos a temperatura ambiente para polimerização e, logo após, foram aplicadas as amostras das proteínas extraídas.

#### **3.1.2.5 Aplicação dos extratos foliares**

Para a aplicação das amostras em gel, a placa de vidro superior foi cuidadosamente removida e, com o auxílio de um pente de aço inoxidável (com 24 dentes de 0,4 cm cada e 0,3 cm entre eles), foram feitos os orifícios para a inserção dos papéis utilizados na extração das proteínas, a distância de dois centímetros da borda do gel.

Em cada gel foi aplicado o número de amostras extraídas na ocasião, conforme a germinação da população de interesse. Uma solução de azul de bromofenol a 0,1% foi aplicada sob as cavidades dos géis para auxiliar na visualização da linha de frente de migração, formada durante a eletroforese. A linha de frente foi, posteriormente, utilizada para a medição das bandas reveladas e correspondentes as diferentes formas isoenzimáticas.

A solução de azul bromofenol a 0,1% foi composta de 0,1 g de azul de bromofenol e 100 ml de álcool etílico.

#### **3.1.2.6 Separação das amostras**

O suporte de vidro que continha o gel de poliacrilamida 10% e as amostras aplicadas foi colocado entre duas cubas eletrolíticas horizontais,

contendo 600 ml da solução tampão A (formando uma ponte). Para efetuar o contato entre o gel e o tampão das cubas, foi utilizado um pedaço de tecido em viscose e resina (“perfex”) mergulhado no tampão. A distância entre os pontos de aplicação das amostras e o tecido era de, aproximadamente, um centímetro, bem como entre uma cuba e outra era de 12 cm. O conjunto (cubas eletrolíticas e gel) foi coberto por uma película de filme plástico durante a migração das amostras, para evitar a desidratação do gel e a evaporação do tampão.

Para a condução da eletroforese horizontal de isoenzimas, o conjunto de cubas foi ligado a uma fonte elétrica por eletrodos (cátodos e ânodos), que realizavam a migração das amostras através de uma corrente elétrica e no sentido do pólo negativo (cátodos) para o pólo positivo (ânodos). Foi mantida uma voltagem constante de 400 volts (V) e uma tensão de corrente elétrica de 40 miliamperes (mA), para que as moléculas migrassem no campo elétrico.

A migração horizontal foi realizada a uma temperatura de 4 °C e a distância percorrida foi padronizada para quando a linha de frente atingia oito centímetros da linha de aplicação, ou cerca de três horas após o início da eletroforese.

### **3.1.2.7 Coloração, revelação e fixação**

Após a eletroforese horizontal, as isoenzimas de esterase foram visualizadas através de corantes histoquímicos específicos, os quais fornecem o substrato para as enzimas. Os papéis cromatográficos de aplicação das amostras foram removidos com o auxílio de uma pinça e o gel foi recortado com estilete a uma faixa de um centímetro das bordas superiores e da linha de frente.

Foi utilizado protocolo modificado de Scandalios (1969) para o preparo da solução de coloração das isoenzimas de esterase. Os reagentes utilizados foram misturados as respectivas soluções tampão C e D (Apêndice 4) no momento da adição aos géis. A solução de coloração foi acondicionada em um recipiente, onde os géis foram mergulhados para a revelação das bandas de atividade enzimática.

Os géis foram incubados a uma temperatura de 37 °C em estufa sem iluminação até o aparecimento das bandas isoenzimáticas, por no mínimo 30 e no máximo 60 minutos. As bandas correspondentes as isoenzimas  $\alpha$  apresentaram coloração marrom-acinzentada, enquanto as isoenzimas  $\beta$  apresentaram coloração avermelhada. Logo após, os géis foram enxaguados em água destilada e fixados em solução de Ayala (Apêndice 5), por 15 minutos. A solução fixadora foi preparada no momento e quantidade de sua utilização. Em seguida, os géis eram enxaguados por três vezes em água destilada, envoltos em película de filme plástico (para evitar desidratação), identificados e estocados a 4 °C.

#### **3.1.2.8 Análise dos dados**

O conjunto de bandas de atividade enzimática (zimograma) de cada gel foi representado através de um esquema. As interpretações dos zimogramas foram realizadas com o auxílio de um transluminador de luz branca.

As bandas foram identificadas por suas cores e sua caracterização foi realizada através de suas taxas de migração. Com o auxílio de uma régua milimetrada, foi medida a distância percorrida por cada banda de atividade enzimática revelada e pela linha de frente. A taxa de migração foi calculada

através da divisão dos valores de distância percorrida pelas bandas de atividade enzimática pela distância percorrida pela linha de frente.

Os géis foram fotografados, envoltos em película de filme plástico e armazenados a temperatura de 4 °C até seu descarte.

Uma matriz binária de presença (1) e ausência (0) foi gerada com base nos padrões de bandas esterase alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) e o programa NTSYSpc versão 2.10m (Rohlf, 2000) foi empregado para realização das análises.

Foi utilizado o coeficiente de Jaccard para a análise de similaridade entre as populações de teosinto e as linhagens de milho. Com os dados de similaridade, um dendograma foi construído através da análise de agrupamento pelo módulo SAHN – NTSYS (Rohlf, 2000), utilizando o método da média aritmética não ponderada (UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*). A fim de verificar a consistência dos agrupamentos, um coeficiente de correlação cofenética foi calculado. O teste de Mantel com 1000 permutações foi realizado para determinar o nível de significância do coeficiente de correlação entre a matriz de similaridade e a matriz cofenética.

### **3.1.3 Análises moleculares**

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura, da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Para detecção de polimorfismo em nível molecular foram utilizados marcadores do tipo microssatélites (SSR) de milho e analisadas duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). Foram analisados vinte e um indivíduos de cada população de teosinto.

### 3.1.3.1 Extração do DNA total

As sementes das populações de teosinto foram cultivadas em papel germinador em agosto de 2006, o qual foi umedecido e mantido a temperatura ambiente (em torno de 25 °C) por, aproximadamente, sete dias. Após a germinação, foram coletadas folhas jovens (em torno de 20 mg) de plantas individuais de cada população. As extrações do DNA de cada planta foram efetuadas conforme protocolo descrito por Murray & Thompson (1980) e a quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,9 % acrescido de brometo de etídeo, para visualização dos fragmentos de DNA vegetal. Um marcador padrão de peso molecular de DNA (*lambda*) foi utilizado para a comparação e estimativa de tamanho dos fragmentos de DNA que foram visualizados em luz ultravioleta. As soluções de trabalho do DNA foram padronizadas a uma concentração de 10 ng/ $\mu$ l. As imagens obtidas foram capturadas pelo programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

### 3.1.3.2 Condições de PCR e amplificação do DNA

Foram utilizados conjuntos de iniciadores específicos para milho na amplificação das regiões microssatélites. As reações foram preparadas em um volume de 20  $\mu$ l cada. Os componentes de cada reação continham as seguintes concentrações finais: tampão para PCR 1x (Tris HCl 20mM, KCl 50mM), magnésio-MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), nucleotídeos-dNTPmix (0,2 mM), iniciador direto (0,3 mM), iniciador reverso (0,3 mM), enzima *Taq* polimerase (1U), DNA genômico (60 ng) e água ultrapura até completar o volume total da reação. As soluções de trabalho dos iniciadores foram preparadas a 20  $\mu$ M. Foram testados 65 pares de iniciadores, escolhidos a partir do Banco de Dados

Genéticos de Milho (Maize Genome Database – [www.agron.missouri.edu](http://www.agron.missouri.edu)), dos quais 25 foram utilizados nas análises (Tabela 1) realizadas nas populações de teosinto. O DNA genômico foi amplificado em termociclador PTC – 100<sup>tm</sup> (MJ Research, Inc) com um programa do tipo *touchdown*, constituído de 18 ciclos de 1 minuto com temperatura de 94 °C seguidos de um decréscimo de 1 °C a cada 2 ciclos (de 69 °C a 60 °C) e 1 ciclo de 1 minuto a 72 °C. Após, foram realizados 20 ciclos de 94 °C por 1 minuto, seguidos de 60 °C por 1 minuto e 72 °C por mais um minuto. No final, as amostras foram submetidas a 72 °C durante 5 minutos.

TABELA 1. Descrição de locos microssatélites analisados em duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). Loco microssatélite, gene relacionado, cromossomo e motivo dos microssatélites utilizados na análise molecular. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.

| Loco    | Gene relacionado   | Cromossomo | Motivo               |
|---------|--|------------|----------------------|
| bnlg439 | -  | 1          | -                    |
| nc004   | <i>adh<sub>2</sub></i> – <i>alcohol dehydrogenase 2</i>                          | 4          | AG                   |
| phi021  | <a href="#">adh<sub>2</sub></a> – <i>alcohol dehydrogenase 2</i>                 | 4          | AG                   |
| phi027  | <a href="#">wx<sub>1</sub></a> – <i>waxy 1</i>                                   | 9          | GCGCT                |
| phi032  | <i>sus<sub>1</sub></i> – <i>sucrose synthase 1</i>                               | 9          | AAAG                 |
| phi037  | -  | 1          | AG                   |
| phi075  | <i>fdx<sub>1</sub></i> – <i>ferredoxin 1</i>                                     | 6          | CT                   |
| phi080  | <a href="#">gst<sub>1</sub></a> – <i>glutathione-S-transferase 1</i>             | 8          | AGGAG                |
| umc1016 | <a href="#">kpp<sub>1</sub></a> – <i>kinase associated protein phosphatase 1</i> | 7          | (CT) <sub>25</sub>   |
| umc1058 | <i>bip2 binding protein homolog 2</i>  | 4          | (GC) <sub>7</sub>    |
| umc1082 | <i>tb<sub>1</sub></i> – <i>teosinte branched 1</i>                               | 1          | (GA) <sub>16</sub>   |
| umc1094 | <a href="#">sod<sub>9</sub></a> – <i>superoxide dismutase 9</i>                  | 9          | -                    |
| umc1172 | <a href="#">pdc<sub>1</sub></a> – <i>pyruvate decarboxylase 1</i>                | 8          | (CCA) <sub>4</sub>   |
| umc1185 | <a href="#">ole<sub>1</sub></a> – <i>oleosin 1</i>                               | 2          | (GC) <sub>8</sub>    |
| umc1309 | <a href="#">hox<sub>1</sub></a> – <i>homeobox 1</i>                              | 8          | (TG) <sub>6</sub>    |
| umc1355 | -  | 5          | (TTTC) <sub>4</sub>  |
| umc1397 | -  | 1          | (ATGCA) <sub>4</sub> |
| umc1426 | -  | 7          | (TG) <sub>6</sub>    |
| umc1576 | <a href="#">gdcp<sub>1</sub></a> – <i>glycine decarboxylase 1</i>                | 10         | (TG) <sub>6</sub>    |
| umc1594 | -  | 3          | (TA) <sub>10</sub>   |
| umc1727 | <i>prc<sub>3</sub></i> – <i>proteasome component 3</i>                           | 1          | (CGT) <sub>4</sub>   |
| umc1799 | -  | 7          | (TG) <sub>12</sub>   |
| umc2047 | -  | 1          | (GACT) <sub>4</sub>  |
| y1SSR   | <a href="#">y<sub>1</sub></a> – <i>yellow endosperm 1</i>                        | 6          | CCA, CCATC, TCATC    |
| ZmRR1   | <a href="#">crr<sub>1</sub></a> – <i>cytokinin response regulator 1</i>          | 2          | -                    |

### 3.1.3.3 Eletroforese e identificação genética

Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, com sistema de tampão Tri-Borato-EDTA (TBE 0,5x), com pH 8,0 e voltagem constante de 145 Volts, durante 2 horas. Ao gel foi adicionado brometo de etídeo para possibilitar a visualização dos fragmentos, os quais foram, posteriormente, observados em luz ultravioleta. O tamanho de cada fragmento observado foi estimado por comparação com DNA padrão de peso molecular conhecido (DNA Ladder de 100 pares de bases ou 50 pares de bases – Invitrogen). A análise dos fragmentos amplificados foi realizada após as imagens terem sido capturadas através do uso do programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

### 3.1.3.4 Análise dos dados

A partir da interpretação do padrão de bandas de cada indivíduo das populações nos géis, foi confeccionada uma matriz binária baseada na presença (1) e ausência (0) de alelos em cada loco microssatélite.

A magnitude da variabilidade genética pertencentes às populações de teosinto foi analisada através da proporção de locos polimórficos, do número total de alelos identificados nos locos, do número médio de alelos por loco e do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) – obtido através da expressão:  $PIC = 1 - \sum p_u^2$ , onde  $p_u$  é a frequência do alelo  $u$ . O cálculo do PIC foi feito com a utilização do Microsoft Excel.

As populações de teosinto e os locos microssatélites foram caracterizados pelo programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analyses* - Miller, 1997), um programa do Windows para analisar dados genéticos e

moleculares. As frequências alélicas foram estimadas e cada loco microssatélite foi submetido ao teste de probabilidade (Haldane, 1954) para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Uma análise da estrutura genética das populações de teosinto foi efetuada através das estimativas de parâmetros de diversidade genética: heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e as estimativas da estatística F ( $F_{is}$ ,  $F_{st}$ ,  $F_{it}$ ) de Wright (1943). Segundo análises do TFPGA, os coeficientes de endogamia  $F_{is}$  e  $F_{it}$  correspondem a  $f$  e  $F$ , respectivamente, bem como  $F_{st}$  corresponde ao  $\Theta$ .

Foi utilizado um método indireto para calcular o fluxo gênico entre as populações de teosinto, proposto por Slatkin (1995), o qual determina que os valores obtidos nas estimativas da estruturação da variabilidade genética podem ser utilizados, em populações sob equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dessa forma, o fluxo gênico ou número de migrantes ( $Nm$ ) foi estimado a partir da seguinte equação:  $Nm = \frac{1}{4} [(1/\Theta) - 1]$ , onde  $\Theta$  é o grau de diferenciação entre as populações para cada loco (obtido através das estimativas da estatística F de Wright, 1943).

Para quantificar a distância entre as populações foi utilizado o coeficiente de Nei (1978).

### **3.2 Formação de gerações segregantes para análises dos cruzamentos dirigidos**

Na obtenção de populações segregantes e nas análises dos cruzamentos dirigidos foram utilizadas duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e três linhagens de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6:

672739). Para a realização dos cruzamentos e retrocruzamentos, as populações de teosinto foram utilizadas como genótipos doadores de grãos de pólen, enquanto que as linhagens de milho foram utilizadas como os genótipos recorrentes.

O controle dos cruzamentos dirigidos foi feito manualmente, com a proteção das inflorescências femininas (espigas) com sacos plásticos, anterior a emissão dos estigmas. Esse procedimento evita a polinização das plantas com pólen indesejável. Quando aproximadamente 50 % das plantas da linha apresentavam liberação de grãos de pólen, os cruzamentos foram realizados com o auxílio de sacos de papel para coleta dos grãos de pólen. Posteriormente, os estigmas foram novamente protegidos (com os mesmos sacos de papel), visando prevenir contaminações de pólen e assegurar a confiabilidade do procedimento (Figura 4).

A descrição dos experimentos está detalhada abaixo.

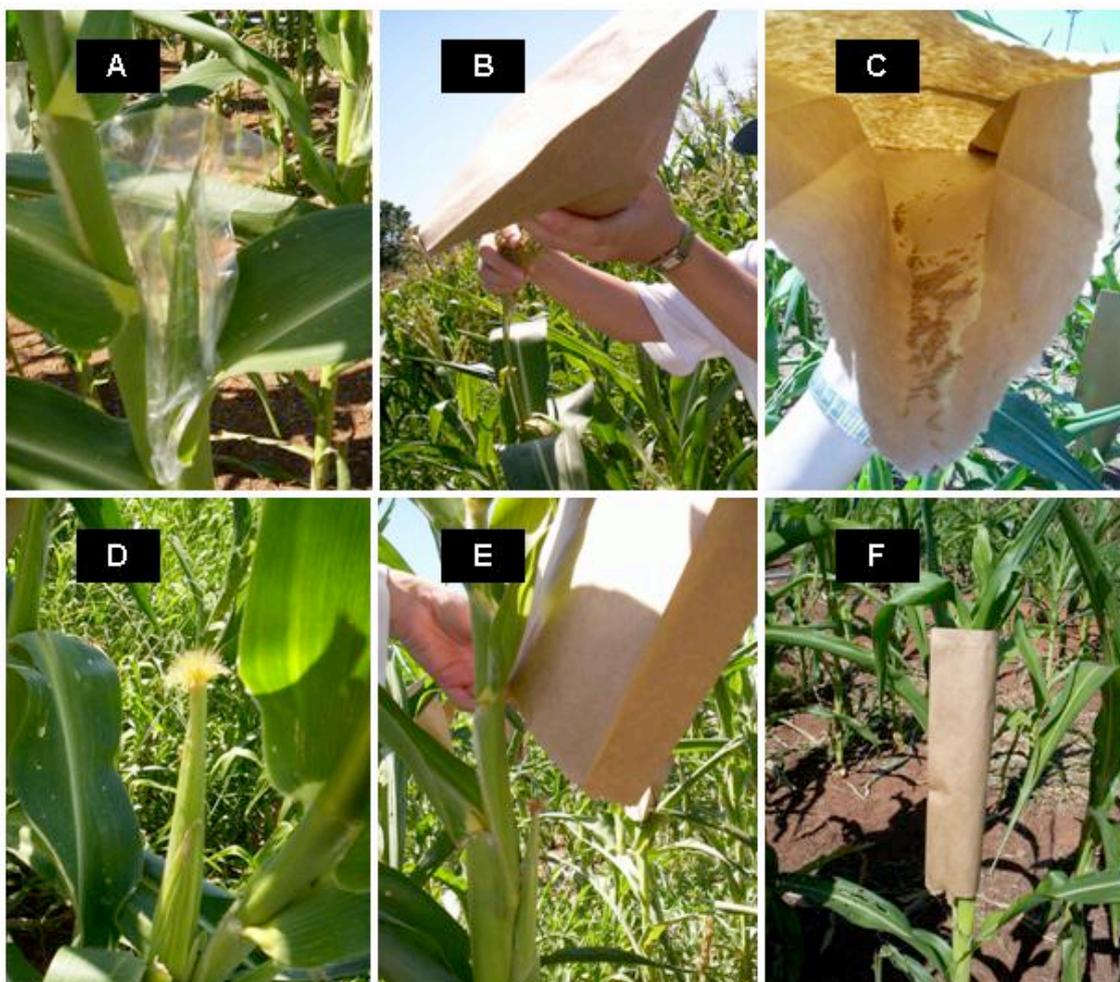


FIGURA 4. Metodologia adotada para a realização dos cruzamentos dirigidos. A) proteção da espiga com saco plástico; B) coleta dos grãos de pólen com saco de papel; C) grãos de pólen recolhidos no saco de papel; D) espiga pronta para receber os grãos de pólen; E) grãos de pólen vertidos sobre a espiga; F) proteção da espiga após o cruzamento. Fotos: Terra, T. F. EEA-UFRGS – Eldorado do Sul, RS. 2007.

### 3.2.1 Geração F<sub>1</sub>

O experimento realizado para a obtenção das populações F<sub>1</sub> foi semeado em novembro de 2005, na sede da EMBRAPA – Clima Temperado. Foram semeadas três linhas de cada população de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e duas linhas de cada linhagem de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), totalizando 12 linhas. Foram utilizadas três sementes por cova, em linhas de cinco metros, com espaçamento de 70 cm entre linhas e 30 cm entre plantas, totalizando 135 plantas de cada população de teosinto e 90 plantas de cada linhagem de milho. Aproximadamente, 20 dias após a semeadura, foi realizado o desbaste mantendo apenas uma planta por cova, totalizando 45 plantas de cada população de teosinto e 30 plantas de cada linhagem de milho. No estágio de quatro a oito folhas por planta foi realizada a aplicação de uréia, estimando-se 100 kg de nitrogênio (N<sub>2</sub>) por hectare.

Os cruzamentos dirigidos foram realizados nos meses de fevereiro e março de 2006. Uma mistura de grãos de pólen proveniente de cada população de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) foi utilizada para o cruzamento com as linhagens (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). Dessa forma, as populações F<sub>1</sub>s foram desenvolvidas a partir dos cruzamentos: P2 x Canguçu; P2 x Monte Bonito; P5 x Canguçu; P5 x Monte Bonito; P6 x Canguçu e P6 x Monte Bonito (Tabela 2).

As sementes F<sub>1</sub>s foram obtidas em maio 2006, as quais foram utilizadas para a realização da primeira geração de retrocruzamento.

TABELA 2. Cruzamentos dirigidos para o desenvolvimento da geração  $F_1$ . EMBRAPA – Pelotas, RS. 2006.

| Genótipos Recorrentes | Genótipos Doadores    | $PF_1$                    |
|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| Linhagem P2: 672733   | Teosinto Canguçu      | $F_1$ : P2 x Canguçu      |
| Linhagem P2: 672733   | Teosinto Monte Bonito | (-)                       |
| Linhagem P5: 672736   | Teosinto Canguçu      | $F_1$ : P5 x Canguçu      |
| Linhagem P5: 672736   | Teosinto Monte Bonito | $F_1$ : P5 x Monte Bonito |
| Linhagem P6: 672739   | Teosinto Canguçu      | (-)                       |
| Linhagem P6: 672739   | Teosinto Monte Bonito | $F_1$ : P6 x Monte Bonito |

Genótipos Recorrentes: linhagens que receberam pólen das populações de teosinto; Genótipos Doadores: populações de teosinto doadoras de pólen;  $PF_1$ : populações  $F_1$  desenvolvidas; (-) populações em que não foram obtidas sementes.

### 3.2.2 Primeira geração de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ )

Os experimentos para a obtenção das populações de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ s) foram instalados na EMBRAPA – Clima Temperado e na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, em outubro de 2006.

Foram semeadas duas linhas com cada genitor recorrente (linhagens P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739) e duas linhas com cada população  $F_1$  (P2 x Canguçu; P5 x Canguçu; P5 x Monte Bonito e P6 x Monte Bonito), totalizando 14 linhas. Foram semeadas três sementes por cova em linhas de cinco metros, com espaçamento de 70 cm entre linhas e 30 cm entre plantas, totalizando 270 plantas dos genitores recorrentes (linhagens) e 360 plantas das populações  $F_1$ . Em torno de 20 dias após a semeadura, foi realizado o desbaste mantendo apenas uma planta por cova, totalizando 90 plantas das linhagens e 120 plantas das populações  $F_1$ s. No estágio de quatro a oito folhas por planta foi realizada a aplicação de uréia (100 kg de nitrogênio por hectare).

A primeira geração de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ ) foi obtida através de cruzamentos dirigidos realizados em janeiro e fevereiro de 2007. As linhagens de milho foram usadas como genitores recorrentes e as plantas da geração  $F_1$  como doadoras de grãos de pólen, sendo  $RC_1F_1$ : P2xCanguçu x P2;  $RC_1F_1$ :

P5xCanguçu x P5; RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>: P5xMonte Bonito x P5 e RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>: P6xMonte Bonito x P6 (Tabela 3).

Em abril de 2007 foram colhidas as sementes de cada local que, posteriormente, foram utilizadas em autofecundações para obtenção de populações de RC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (item 3.2.3).

Como a produção de grãos da primeira geração de retrocruzamento foi reduzida, em dezembro de 2007 um novo experimento foi instalado e os mesmos genótipos semeados na Faculdade de Agronomia da UFRGS para a obtenção de maior quantidade de sementes. Foram semeadas sete linhas da população F<sub>1</sub>: P5 x Canguçu, sendo uma semente por cova e, aproximadamente, 15 plantas por linha, totalizando 105 plantas nas sete linhas. Para as demais populações F<sub>1</sub>'s (F<sub>1</sub>: P2 x Canguçu e P6 x Monte Bonito) foram semeadas duas linhas de cada população, sendo 15 plantas por linha e totalizando 60 plantas nas quatro linhas. Para a linhagem P5: 672736 foram semeadas cinco linhas, sendo 15 plantas por linha e totalizando 75 plantas. As linhagens de milho P2: 672733 e P6: 672739 foram semeadas em duas linhas para cada população, sendo 15 plantas por linha de cada linhagem de milho, totalizando 60 plantas nas quatro linhas.

TABELA 3. Cruzamentos dirigidos para o desenvolvimento da primeira geração de retrocruzamento (RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>). Pelotas e Eldorado do Sul, RS, 2007.

| Genótipos Recorrentes | Genótipos Doadores                 | PRC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>                       |
|-----------------------|------------------------------------|---|
| Linhagem P2: 672733   | F <sub>1</sub> : P2 x Canguçu      | RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : P2xCanguçu x P2      |
| Linhagem P5: 672736   | F <sub>1</sub> : P5 x Canguçu      | RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : P5xCanguçu x P5      |
| Linhagem P5: 672736   | F <sub>1</sub> : P5 x Monte Bonito | RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : P5xMonte Bonito x P5 |
| Linhagem P6: 672739   | F <sub>1</sub> : P6 x Monte Bonito | RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : P6xMonte Bonito x P6 |

Genótipos Recorrentes: linhagens que receberam pólen das populações F<sub>1</sub>; Genótipos Doadores: populações F<sub>1</sub> doadoras de pólen; PRC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>: populações de retrocruzamento (RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>) desenvolvidas.

### **3.2.3 Geração RC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (autofecundações)**

Em dezembro de 2007 foi instalado o experimento para a autofecundação da primeira geração de retrocruzamento, na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Foram utilizadas linhas de cinco metros, com espaçamento de 70 cm entre linhas, 30 cm entre plantas e uma semente por cova. Foram semeadas duas linhas e, aproximadamente, 30 plantas de cada população de retrocruzamento (RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>: P5xCanguçu x P5; RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>: P2xCanguçu x P2; RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>: P6xMonte Bonito x P6), totalizando 90 plantas nas seis linhas. No mês de janeiro de 2008 foi realizada a aplicação de uréia, estimando-se 100 kg de nitrogênio (N) por hectare. Para o controle de insetos foi aplicado o inseticida Dipel (2,5 g/L), 35 dias após semeadura.

As autofecundações foram realizadas em fevereiro de 2008, utilizando pólen das plantas da primeira geração de retrocruzamento (RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>) para verter sobre seus próprios estigmas. O experimento foi colhido em maio de 2008.

### **3.2.4 Análise dos cruzamentos dirigidos a partir da viabilidade dos grãos de pólen**

O estudo de viabilidade dos grãos de pólen foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS (Porto Alegre, RS). A análise foi realizada nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito), nas linhagens de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739) e nas gerações segregantes (F<sub>1</sub>s e de retrocruzamento: RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>s), obtidas de cruzamentos dirigidos entre milho e teosinto. Os genótipos

avaliados estão dispostos na Tabela 4. Abaixo estão detalhadas as etapas seguidas:

TABELA 4. Genótipos avaliados quanto à viabilidade dos grãos de pólen nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito), nas linhagens (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), nas populações F<sub>1</sub>s e nas populações de retrocruzamento (RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>s), obtidas de cruzamentos entre milho e teosinto. Eldorado do Sul e Porto Alegre, RS. 2007-2008.

| Genótipos   | Nº de plantas |
|---|---------------|
| Canguçu   | 06            |
| Monte Bonito  | 08            |
| Total teosinto  | 14            |
| P2: 672733  | 08            |
| P5: 672736  | 05            |
| P6: 672739  | 03            |
| Total milho   | 16            |
| F <sub>1</sub> : P2 x Canguçu                           | 04            |
| F <sub>1</sub> : P5 x Canguçu                           | 05            |
| F <sub>1</sub> : P6 x Monte Bonito                      | 02            |
| Total F <sub>1</sub> s                                  | 11            |
| RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : (P2 x Canguçu)xP2      | 05            |
| RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : (P5 x Canguçu)xP5      | 04            |
| RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : (P6 x Monte Bonito)xP6 | 03            |
| Total RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> s                  | 12            |

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

O material foi coletado em dois períodos distintos: em janeiro de 2007, na Estação Experimental Agronômica (EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS) e de fevereiro a março de 2008, na Faculdade de Agronomia da UFRGS (Porto Alegre, RS).

No período de florescimento, foi coletado o número máximo de inflorescências masculinas (pendões) disponíveis por genótipo em fases diversas do desenvolvimento vegetal. Para análise da viabilidade dos grãos de pólen, foram utilizadas inflorescências próximas a fase de antese. O material foi fixado em solução Carnoy (três partes de álcool etílico 99% : uma parte de ácido acético glacial) e mantido pelo período de 24h, em temperatura ambiente

para, posteriormente, ser transferido para álcool 70% e mantido a uma temperatura de – 20 °C, até a confecção das lâminas para as análises.

#### **3.2.4.2 Preparo das lâminas**

As lâminas foram confeccionadas utilizando o corante carmim propiônico na concentração de 2% para visualização da coloração das células. As inflorescências foram transferidas para uma placa de Petri contendo álcool 70%, em cada ocasião de preparo das lâminas. Um botão floral foi retirado e colocado sobre uma lâmina para que, com auxílio de lupa e agulha histológica, as três anteras fossem separadas. Com um conta-gotas foi colocado o corante carmim propiônico sobre as anteras que, posteriormente, foram esmagadas com uma lanceta, sendo retirados e eliminados os fragmentos maiores das mesmas com o auxílio de pinças, mantendo apenas o corante e os grãos de pólen. As anteras foram cobertas com uma lamínula. As lâminas foram identificadas e, imediatamente, observadas ao microscópio óptico.

#### **3.2.4.3 Análise dos dados**

A viabilidade dos grãos de pólen foi estimada de acordo com a capacidade de coloração dos mesmos com o corante carmim propiônico. Foram considerados viáveis os grãos de pólen que apresentaram a coloração vermelha de maneira uniforme em seu citoplasma, com tamanho normal e um único poro. Os inviáveis apresentaram ausência de coloração e/ou alguma irregularidade (forma, tamanho, múltiplos poros). Os genótipos foram amostrados com, pelo menos, três repetições, ou seja, três inflorescências diferentes para cada genótipo. Foram preparadas três lâminas de cada

inflorescência, sendo que 200 grãos de pólen por lâmina foram analisados, totalizando 600 grãos por inflorescência, para cada repetição. O percentual de grãos de pólen viáveis foi estimado, através da divisão do número de grãos corados pelos observados por lâmina e multiplicados por 100. Todas as observações foram feitas com o auxílio de um microscópio óptico interligado a um programa computacional de captação de imagens, o qual permitia uma análise detalhada das células, de acordo com o aumento utilizado no microscópio.

### **3.2.5 Análise dos cruzamentos dirigidos a partir da média de sementes**

As populações segregantes ( $F_1$ s e de retrocruzamentos:  $RC_1F_1$ s e  $RC_1F_2$ s), oriundas de cruzamentos dirigidos entre as duas subespécies (*Zea mays* subsp. *mays* e *Zea mays* subsp. *mexicana*), foram utilizadas para avaliar a compatibilidade dos cruzamentos realizados. As atividades foram realizadas no período agrícola de 2006-2007 e 2007-2008. Foram registrados o número de sementes semeadas e o número de cruzamentos realizados por população. A análise de compatibilidade dos cruzamentos dirigidos foi efetuada a partir de uma estimativa do número médio de sementes resultantes de cada cruzamento realizado entre as populações de milho e de teosinto.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Estimativas da variabilidade genética**

A variabilidade genética é de essencial interesse para os melhoristas de plantas, visto que possibilita progressos em espécies cultivadas através do melhoramento genético. Além de que viabiliza o emprego de técnicas que possibilitam a identificação de genótipos superiores (Coimbra *et al.*, 2004).

A ausência de caracterização da variabilidade existente no teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) é uma das causas principais para a restrita utilização do germoplasma, uma vez que os trabalhos realizados têm sido direcionados, principalmente, ao estudo de seu relacionamento evolutivo com o milho (White & Doebley, 1998; Wang *et al.*, 1999; Lauter & Doebley, 2002; Doebley, 2004; Yamasaki, 2007), restringindo sua utilização a forragem de verão para o gado de leite, nas pequenas propriedades do sul do Brasil (Motta & Maia, 1999).

#### **4.1.1 Análises fenotípicas**

Tradicionalmente, os melhoristas têm utilizado informações fenotípicas para caracterizar a variabilidade genética existente, principalmente, em espécies extensivamente estudadas como o milho. O teosinto, proximamente relacionado ao milho, apresenta elevado potencial como recurso genético para

o melhoramento da cultura sem, entretanto, possuir descrição adequada, principalmente, em relação a características de interesse agrônomo.

Neste trabalho, foram avaliadas duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e três testemunhas (linhagens de milho P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), quanto a variação em oito características morfológicas: estatura de planta (EST), altura de inserção da espiga (INSE), comprimento do internódio (CI), número de internódios (NI), número de folhas acima da primeira espiga (NFACE), número de folhas abaixo da primeira espiga (NFABE), comprimento da folha de inserção da primeira espiga (CFIE) e largura da folha de inserção da primeira espiga (LFIE). A escolha das características morfológicas foi baseada em Melo *et al.* (2001).

O coeficiente de variação (Cv %) é utilizado para indicar o nível de precisão com que as características fenotípicas foram estimadas. Em geral, foram observados valores reduzidos de CV's % para a maioria das características (Tabela 5). Os coeficientes de variação relacionados aos caracteres fenotípicos avaliados em Eldorado do Sul e em Pelotas, nas duas populações de teosinto e nas três linhagens de milho (testemunhas), variaram entre 5,85% (estatura) e 20,97% (número de folhas acima da espiga), indicando que houve precisão experimental.

Scapim *et al.* (1995) desenvolveram uma classificação dos coeficientes de variação (CV %) para milho, baseada em resultados de 66 teses desenvolvidas nas áreas de genética e melhoramento vegetal. Seguindo esta classificação, os coeficientes obtidos neste trabalho para estatura de planta (5,85%) e altura de inserção da espiga (6,83%) seriam considerados como médios (4.5 – 9.0 e 6.5 – 13.0, respectivamente). Para os demais caracteres

avaliados neste estudo, não existem valores propostos, embora, Netto *et al.* (2002) tenham relatado valores de CV % entre 6 e 25, para diversas características agrônômicas.

Os caracteres estatura de planta (EST), altura de inserção da espiga (INSE), comprimento do internódio (CI), número de internódios (NI), comprimento da folha de inserção da primeira espiga (CFIE) e número de folhas abaixo da primeira espiga (NFABE) apresentaram significância na análise de variância para a interação genótipo x local, indicando que o ambiente influenciou na expressão dessas características nos genótipos avaliados (Tabela 5). Esse resultado já era esperado, visto que os caracteres analisados são considerados quantitativos (Sibov *et al.*, 2003; Enoki *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008), ou seja, controlados por vários genes, muito influenciados pelo ambiente, onde o efeito de cada gene é pequeno na expressão do caráter (Bueno *et al.*, 2001).

Nos caracteres que não apresentaram significância para interação genótipo x ambiente – número de folhas acima da primeira espiga (NFACE) e largura da folha de inserção da primeira espiga (LFIE) – foram observadas diferenças significativas para genótipo e para local. Segundo revisão de Melo *et al.* (2001), a significância no efeito de cultivares, quando considerados diversos caracteres agrônômicos, em princípio, indica que existe divergência genética entre eles.

TABELA 5. Resumo da análise de variância (QME) nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e nas testemunhas (linhagens de milho P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), em relação aos caracteres estatura (EST), altura de inserção da espiga (INSE), comprimento do internódio (CI), número de internódios (NI), número de folhas acima da primeira espiga (NFACE), número de folhas abaixo da primeira espiga (NFABE), comprimento da folha de inserção da primeira espiga (CFIE) e largura da folha de inserção da primeira espiga (LFIE), avaliados em Pelotas e em Eldorado do Sul, RS. 2006-2007.

| Causas de variação | EST        | INSE                 | CI         | NI       | NFACE              | NFABE              | CFIE      | LFIE               |
|--------------------|------------|----------------------|------------|----------|--------------------|--------------------|-----------|--------------------|
| Genótipo           | 5442,57**  | 7958,93**            | 17364,54** | 18,36**  | 19,38**            | 51,37**            | 246,31**  | 33,84**            |
| Local              | 43470,42** | 150,52 <sup>ns</sup> | 49734,87** | 487,08** | 37,29**            | 0,83 <sup>ns</sup> | 7153,03** | 13,32**            |
| Genótipo x Local   | 5376,33**  | 2530,25**            | 20165,53** | 35,87**  | 1,48 <sup>ns</sup> | 6,32**             | 1006,19** | 2,55 <sup>ns</sup> |
| Erro               | 175,84     | 110,58               | 125,91     | 0,86     | 0,55               | 1,17               | 35,60     | 1,38               |
| Médias             |            |                      |            |          |                    |                    |           |                    |
| Canguçu            | 235,16     | 168,51               | 15,04      | 12,79    | 2,94               | 8,83               | 56,19     | 4,98               |
| Monte Bonito       | 225,91     | 156,95               | 17,56      | 11,09    | 2,98               | 9,71               | 55,72     | 5,46               |
| Milho              | 197,00     | 83,30                | 13,50      | 8,00     | 5,31               | 4,87               | 71,20     | 9,39               |
| CV (%)             | 5,85       | 6,83                 | 9,92       | 8,72     | 20,97              | 13,21              | 10,22     | 20,01              |

\*\* significativo a 1%; ns não significativo

A tabela 5 traz as médias encontradas para as características avaliadas neste trabalho. O caráter estatura de planta (EST) apresentou média de 225,91 cm na população de teosinto Monte Bonito, 235,16 cm na população Canguçu e 197 cm nas linhagens testemunhas de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). Conforme Motta & Maia (1999), a estatura de planta em populações de teosinto pode variar entre um metro e meio e quatro metros, podendo atingir, excepcionalmente, até cinco metros. Sendo assim, as populações Canguçu e Monte Bonito apresentaram estatura reduzida, quando comparadas ao máximo que a subespécie pode exibir, com valores próximos aos encontrados para as linhagens testemunhas de milho.

Considerando que a análise da variabilidade dessas populações foi realizada visando, principalmente, caracterizá-las para serem aproveitadas pelo melhoramento genético de milho, estaturas reduzidas seriam desejáveis em teosinto, por exemplo, para realização de cruzamentos interespecíficos, onde o resultado fosse um híbrido mais similar ao milho, o que é importante para a cultura.

Para altura de inserção da espiga (INSE), as médias observadas foram de 168,51 cm na população Canguçu, 156,95 cm na população Monte Bonito e 83,30 cm nas linhagens testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). Valores médios similares aos obtidos neste estudo para o teosinto foram obtidos por Wiethölter (2005), para o mesmo caráter, em genótipos de milho crioulo (130 cm) e por Brachtvogel (2008), em populações de milho híbrido (120 cm).

Para as características comprimento do internódio (CI) e número de internódios (NI), as populações de teosinto apresentaram médias de 15,04 cm

e 12,79 para Canguçu, bem como 17,56 cm e 11,09 cm para Monte Bonito (respectivamente). Nas linhagens de milho usadas como testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739) as médias observadas foram de 13,50 cm para comprimento do internódio e 8,0 para número de internódios. Distâncias superiores entre os internódios, bem como elevado número de internódios, são características de plantas silvestres, indesejáveis para o melhoramento genético do milho, o qual apresenta estrutura de planta domesticada (mais compacta).

Para o número de folhas acima da espiga (NFACE), foi observada média de 2,94 para Canguçu, 2,98 para Monte Bonito e 5,31 para as linhagens testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). Para número de folhas abaixo da espiga (NFABE), a média foi de 4,87 nas linhagens testemunhas de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), 8,83 na população de teosinto Canguçu e 9,71 em Monte Bonito. Para comprimento da folha de inserção da primeira espiga (CFIE), a média foi de 55,72 cm para Monte Bonito, 56,19 cm para Canguçu e 71,20 cm para as linhagens testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), bem como para a largura da folha de inserção da primeira espiga (LFIE), cujas médias foram de 4,98 cm para população de teosinto Canguçu, 5,46 cm para Monte Bonito e 9,39 cm para as linhagens testemunhas de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739).

Motta & Maia (1999) apresentaram médias superiores de comprimento da folha da primeira espiga (entre 70-90 cm), bem como, aproximadamente, oito centímetros de largura, para genótipos de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*). Esta redução nos caracteres CFIE e LFIE das populações de teosinto avaliadas neste trabalho pode ser devido ao seu cultivo estar

direcionado à utilização como forragem de corte para o gado, de pequenas propriedades, onde são produzidas suas próprias sementes e, conseqüentemente, a seleção do agricultor para plantas mais compactas, é uma força atuante.

Para classificar os genótipos quanto à variação entre os caracteres que apresentaram significância na interação genótipo x ambiente, na análise de variância, as médias foram comparadas pelo método Tukey-Kramer, o qual utiliza médias ajustadas pelo LSMean – no caso de significância para as interações genótipo x local (Tabela 6). Por esta razão as médias apresentadas nesta tabela diferenciam das médias apresentadas na análise de variância dos caracteres agrônômicos (Tabela 5), citada anteriormente.

Os resultados indicaram que, para os caracteres estatura de planta (EST) e altura de inserção da espiga (INSE), em Pelotas, a população de teosinto Canguçu foi significativamente mais alta que a população Monte Bonito, e ambas superiores às linhagens testemunhas de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). Já em Eldorado do Sul, não foram observadas diferenças significativas entre as duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) para as mesmas características (EST e INSE), indicando que o ambiente, provavelmente, não favoreceu a expressão de determinados alelos que foram expressos em Pelotas e determinaram as diferenças entre as populações.

TABELA 6. Análise da interação genótipo x ambiente dos caracteres fenotípicos avaliados nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e nas testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), através do Teste Tukey-Kramer com médias ajustadas (LSMean). Pelotas e Eldorado do Sul, RS. 2006-2007.

| Caráter         | Local           | População    | Média        |          |
|-----------------|-----------------|--------------|--------------|----------|
| EST             | Pelotas         | Canguçu      | 275,83 a     |          |
|                 | Pelotas         | Monte Bonito | 245,42 b     |          |
|                 | Pelotas         | P2: 672733   | 177,50 c     |          |
|                 | Pelotas         | P5: 672736   | 207,50 c     |          |
|                 | Pelotas         | P6: 672739   | 205,00 c     |          |
|                 | Eldorado do Sul | Canguçu      | 194,48 ns    |          |
|                 | Eldorado do Sul | Monte Bonito | 206,39 ns    |          |
|                 | INSE            | Pelotas      | Canguçu      | 174,00 a |
|                 |                 | Pelotas      | Monte Bonito | 147,92 b |
|                 |                 | Pelotas      | P2: 672733   | 62,50 d  |
| Pelotas         |                 | P5: 672736   | 95,00 c      |          |
| Pelotas         |                 | P6: 672739   | 92,50 d      |          |
| Eldorado do Sul |                 | Canguçu      | 163,02 ns    |          |
| Eldorado do Sul |                 | Monte Bonito | 165,98 ns    |          |
| CI              |                 | Pelotas      | Canguçu      | 13,92 b  |
|                 |                 | Pelotas      | Monte Bonito | 19,00 a  |
|                 |                 | Pelotas      | P2: 672733   | 14,50 b  |
|                 | Pelotas         | P5: 672736   | 13,75 b      |          |
|                 | Pelotas         | P6: 672739   | 14,25 b      |          |
|                 | Eldorado do Sul | Canguçu      | 16,16 a      |          |
|                 | Eldorado do Sul | Monte Bonito | 16,12 a      |          |
|                 | Eldorado do Sul | P5: 672736   | 10,45 b      |          |
|                 | Eldorado do Sul | P6: 672739   | 5,96 c       |          |
|                 | NI              | Pelotas      | Canguçu      | 15,33 a  |
| Pelotas         |                 | Monte Bonito | 12,50 b      |          |
| Pelotas         |                 | P2: 672733   | 15,00 a      |          |
| Pelotas         |                 | P5: 672736   | 15,00 a      |          |
| Pelotas         |                 | P6: 672739   | 15,00 a      |          |
| Eldorado do Sul |                 | Canguçu      | 10,25 a      |          |
| Eldorado do Sul |                 | Monte Bonito | 9,69 ab      |          |
| Eldorado do Sul |                 | P5: 672736   | 5,75 b       |          |
| Eldorado do Sul |                 | P6: 672739   | 4,37 b       |          |
| NFACE           |                 | Pelotas      | Canguçu      | 4,33 b   |
|                 | Pelotas         | Monte Bonito | 4,33 b       |          |
|                 | Pelotas         | P2: 672733   | 7,00 a       |          |
|                 | Pelotas         | P5: 672736   | 6,00 ab      |          |
|                 | Pelotas         | P6: 672739   | 5,50 ab      |          |
|                 | Eldorado do Sul | Canguçu      | 1,54 c       |          |
|                 | Eldorado do Sul | Monte Bonito | 1,62 c       |          |
|                 | Eldorado do Sul | P2: 672733   | 6,00 a       |          |
|                 | Eldorado do Sul | P5: 672736   | 4,28 b       |          |

TABELA 6. Continuação... Análise da interação genótipo x ambiente dos caracteres fenotípicos avaliados nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e nas testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), através do Teste Tukey-Kramer com médias ajustadas (LS MEAN). Pelotas e Eldorado do Sul, RS. 2006-2007.

| Caráter         | Local           | População    | Média        |          |
|-----------------|-----------------|--------------|--------------|----------|
| NFABE           | Pelotas         | Canguçu      | 8,83 a       |          |
|                 | Pelotas         | Monte Bonito | 8,92 a       |          |
|                 | Pelotas         | P2: 672733   | 5,50 b       |          |
|                 | Pelotas         | P5: 672736   | 5,50 b       |          |
|                 | Pelotas         | P6: 672739   | 6,00 b       |          |
|                 | Eldorado do Sul | Canguçu      | 8,83 b       |          |
|                 | Eldorado do Sul | Monte Bonito | 10,50 a      |          |
|                 | Eldorado do Sul | P2: 672733   | 3,33 c       |          |
|                 | Eldorado do Sul | P5: 672736   | 4,86 c       |          |
|                 | CFIE            | Pelotas      | Canguçu      | 79,67 ns |
| Pelotas         |                 | Monte Bonito | 76,75 ns     |          |
| Pelotas         |                 | P2: 672733   | 70,00 ns     |          |
| Pelotas         |                 | P5: 672736   | 72,00 ns     |          |
| Pelotas         |                 | P6: 672739   | 74,00 ns     |          |
| Eldorado do Sul |                 | Canguçu      | 32,71 b      |          |
| Eldorado do Sul |                 | Monte Bonito | 34,69 b      |          |
| Eldorado do Sul |                 | P5: 672736   | 69,67 a      |          |
| LFIE            |                 | Pelotas      | Canguçu      | 5,37 b   |
|                 |                 | Pelotas      | Monte Bonito | 6,50 b   |
|                 | Pelotas         | P2: 672733   | 7,50 a       |          |
|                 | Pelotas         | P5: 672736   | 10,75 a      |          |
|                 | Pelotas         | P6: 672739   | 9,50 a       |          |
|                 | Eldorado do Sul | Canguçu      | 4,59 b       |          |
|                 | Eldorado do Sul | Monte Bonito | 4,43 b       |          |
|                 | Eldorado do Sul | P5: 672736   | 9,67 a       |          |

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste Tukey-Kramer com médias ajustadas (LS MEAN) a 5% de probabilidade.

Para o caráter comprimento do internódio (CI), em Pelotas, a população de teosinto Monte Bonito apresentou média significativamente superior à população Canguçu, sendo que, a média desta última população, não apresentou diferença significativa em relação às médias das linhagens testemunhas de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). Em de Eldorado do Sul, as médias das populações de teosinto apresentaram diferenças significativas em relação às médias das linhagens testemunhas,

sendo que, a média da linhagem de milho P5: 672736 foi significativamente superior a média da linhagem de milho P6: 672739. Dessa forma, para esse caráter, o ambiente de Eldorado do Sul favoreceu à expressão de determinados alelos que possibilitaram a expressão de diferenças entre as populações de teosinto e as linhagens testemunhas de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739).

Para o caráter número de internódios (NI), em Pelotas, a população Canguçu e as linhagens testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739) não apresentaram diferenças significativas entre suas médias, porém as mesmas foram superiores a população de teosinto Monte Bonito. Já em Eldorado do Sul, Canguçu e Monte Bonito apresentaram comportamento similar, porém Canguçu apresentou médias significativamente superiores às linhagens testemunhas de milho, ao contrário da população de teosinto Monte Bonito.

Quanto ao número de folhas acima da primeira espiga (NFACE), em ambos os experimentos, as duas populações de teosinto não apresentaram médias significativamente diferentes entre si, entretanto, os valores encontrados foram inferiores aos observados nas linhagens testemunhas de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). De modo que, em Pelotas, a média da linhagem de milho P2: 672733 foi significativamente superior àquela observada para a linhagem P5: 672736.

Para a característica número de folhas abaixo da primeira espiga (NFABE), em Pelotas, não foram observadas diferenças significativas entre as médias das populações de teosinto. No entanto, em Eldorado do Sul, a população Monte Bonito apresentou média significativamente superior à

população Canguçu e, nos dois locais avaliados, as duas populações de teosinto apresentaram valores significativamente superiores às linhagens testemunhas de milho.

Em milho, a redução da quantidade de folhas é um caráter desejado (Balbinot Junior, 2007), pois resulta em maior quantidade de energia para o grão. Entretanto, considerando o uso do teosinto como forragem de corte, a redução da quantidade de folhas se apresenta como desvantajosa, uma vez que está diretamente relacionada à quantidade de matéria verde produzida para alimentação animal.

Em Pelotas, não foram observadas diferenças significativas entre as médias das populações de teosinto e das linhagens testemunhas para o comprimento da folha de inserção da primeira espiga (CFIE). Da mesma forma que em Eldorado do Sul, onde não foram observadas diferenças entre as médias das populações de teosinto, entretanto, ambas apresentaram médias inferiores às linhagens testemunhas (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739).

Para largura da folha de inserção da primeira espiga (LFIE), não foram observadas diferenças significativas entre as populações de teosinto, tanto em Pelotas quanto em Eldorado do Sul. No entanto, em ambos os experimentos, as populações de teosinto foram significativamente inferiores às testemunhas.

Dentro dos caracteres agrônômicos importantes ao melhoramento genético do milho, número e tamanho de folhas, estão diretamente relacionados com o índice de área foliar (Winkler, 2006), o qual está diretamente relacionado com uma maior capacidade fotossintética. Embora, sob altas densidades de plantas na semeadura (o que é desejado pelo melhoramento, pois resulta no aumento do rendimento de grãos), a quantidade

de luz seja diminuída e, conseqüentemente, o desenvolvimento das ramificações laterais seja suprimido, podendo levar a esterilidade feminina (Sangoi *et al.*, 2002). Dessa forma, o teosinto pode contribuir para a melhoria de características importantes na cultura do milho, visto que foram encontradas diferenças significativas entre as testemunhas (linhagens de milho P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739) e as populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) para os componentes relacionados com a estruturação das folhas nas plantas.

#### **4.1.1.1 Distância genética**

Em função das características fenotípicas avaliadas, as populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e as testemunhas (linhagens de milho P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739) foram agrupadas de acordo com sua distância genética.

De acordo com Benin *et al.* (2003), a quantificação da dissimilaridade genética é um dos mais importantes parâmetros estimados para finalidades de melhoramento, principalmente, quando o objetivo for a obtenção de ampla variabilidade genética.

Neste contexto, os métodos multivariados – em que diversos caracteres podem ser dimensionados simultaneamente – têm contribuído na identificação de genótipos para serem utilizados em programas de melhoramento genético de várias culturas (Santos *et al.*, 2000), inclusive com indicação de caracteres mais representativos para a obtenção de populações geneticamente diferentes.

A distância genética entre as populações teosinto e as testemunhas (linhagens de milho) foi estimada através dos dados obtidos em uma matriz de

distância euclidiana e apresentou diferentes magnitudes, sendo que foi obtida uma média de 0,84 entre as populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e 0,88 entre as populações de teosinto e as testemunhas (linhagens de milho P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). O maior valor de distância observada foi de 1,20 entre os genótipos de teosinto Canguçu e da linhagem de milho P5: 672736 e a menor (0,48) se estabeleceu entre linhagens de milho P5: 672736 e P6: 672739.

O dendograma (Figura 5) foi dividido no ponto de distância média (0,84) entre as populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito), formando três grupos distintos. O primeiro grupo formado (G1) agrupou os genótipos de teosinto Canguçu, no segundo grupo formado (G2) foi observado um relacionamento mais próximo da população de teosinto Monte Bonito com as linhagens de milho P5: 672736 e P6: 672739. Já a linhagem de milho P2: 672733 compôs um grupo independente das demais (G3). A análise de agrupamentos por distância indica que a população de teosinto Canguçu está mais distante das testemunhas (linhagens de milho P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). No entanto, a proximidade observada para a população de teosinto Monte Bonito pode ser devida ao número limitado de caracteres agrônômicos avaliados, bem como ao número de amostragem utilizado em cada população constituinte deste estudo.

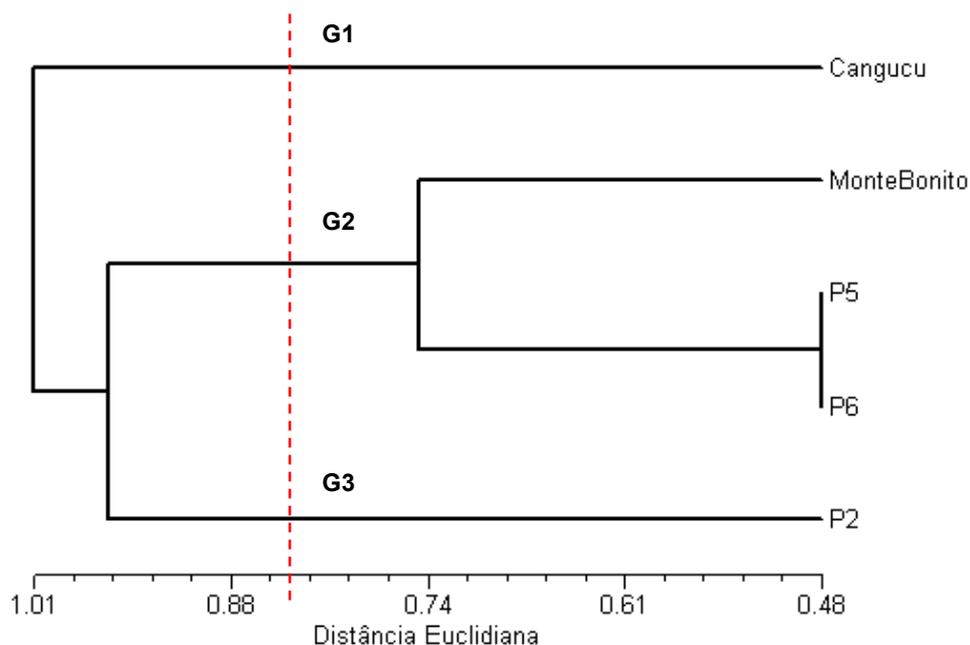


FIGURA 5. Agrupamento baseado na Distância Euclidiana (SAHN – NTSYS), em função dos caracteres agronômicos avaliados em Pelotas e Eldorado do Sul, RS. 2006-2007.

De maneira geral, os genótipos de teosinto mantêm sua variabilidade genética similar a originalmente encontrada em uma espécie silvestre – demonstrada pela distância das linhagens de milho no dendograma. Dessa forma, as diferenças encontradas entre teosinto e milho, refletem a presença de variabilidade genética específica no teosinto para a expressão das características fenotípicas avaliadas neste estudo.

Através desses resultados, foi possível verificar que existe ampla variabilidade entre as populações de teosinto, bem como em relação às linhagens testemunhas de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739). Sendo assim, é provável que, além da variabilidade observada entre milho e teosinto para esses caracteres, exista variabilidade para diversas outras características, tais como tolerância a estresses bióticos e abióticos, os quais poderiam contribuir significativamente para o melhoramento genético do milho.

Hallauer & Miranda Filho (1981) definem que são preferíveis cruzamentos entre populações ou genitores que apresentem altas médias e divergência ampla nas características morfológicas de interesse.

Moro *et al.* (2007) relataram dissimilaridade genética entre 64 linhagens de milho, avaliadas para identificar as melhores combinações híbridas, permitindo determinar sete grupos distintos.

Atualmente, diversas técnicas têm sido utilizadas para investigar a variabilidade genética existente nos mais diversos materiais. As análises com descritores morfológicos realizadas neste trabalho podem ser complementadas com marcadores bioquímicos e moleculares, os quais permitem caracterizar as populações e identificar características desejáveis através do genótipo, além do fenótipo.

#### **4.1.2 Análises bioquímicas**

Isoenzimas são poderosos marcadores bioquímicos para acessar a variabilidade genética disponível em diferentes materiais, e têm sido utilizadas em estudos taxonômicos, evolutivos, genéticos e ecológicos (Lange & Schifino-Wittmann, 2000).

O sistema enzimático das esterases é considerado como complexo e apresenta variações consideráveis (Scandalios, 1969). No entanto, as esterases têm sido amplamente estudadas em milho (Tanksley & Rick, 1980; Abbot *et al.*, 1984; Ainsworth *et al.*, 1984; Sanches *et al.*, 2000; Sanches *et al.*, 2006; Sanches *et al.*, 2007), estando entre as enzimas com maior polimorfismo observado. O alto grau de polimorfismo apresentado por esta enzima está relacionado ao fato de pertencerem ao metabolismo periférico (Weeden &

Wendel, 1990). As esterases apresentam importante função fisiológica, visto que originam ácidos livres e compostos alcoólicos, os quais são essenciais em processos metabólicos oxidativos, como transporte de ácidos, ressíntese de compostos alcoólicos e fosfóricos, entre outros (Oliveira, 1976).

Neste estudo, foram analisados 64 genótipos, sendo 14 genótipos milho (sete da linhagem P2: 672733 e sete da linhagem P5: 672736) e 50 genótipos de teosinto (21 da população Monte Bonito e 29 da Canguçu).

As análises apresentadas a seguir foram baseadas nos dados de migração relativa e nos padrões de especificidades obtidos para as zonas de atividade de alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) esterases. Os resultados apresentam os padrões isoenzimáticos de esterase observados nos genótipos de cada população, sendo que determinações de locos e alelos não foram efetuadas. Segundo Simpson & Withers (1986), a caracterização de populações por isoenzimas pode determinar o grau de similaridade entre genótipos através da comparação de seus zimogramas e contagem do número de bandas de atividade enzimática, sem inferir sobre o controle genético das mesmas.

Tanto as populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) quanto às linhagens de milho (P2: 672733 e P5: 672736) apresentaram polimorfismo para o sistema de esterases. De acordo com resultados de Lange e Schifino-Wittmann (2000), que também observaram uma alta variabilidade pelo sistema das esterases no gênero *Trifolium* L.. As autoras acrescentaram que o sistema de esterase é um dos mais satisfatórios para o acesso a variabilidade genética de populações, bem como apresenta estabilidade na coloração das bandas de atividade enzimática.

Foi detectado um total de 12 bandas de esterases, sendo seis bandas alfa ( $\alpha$ ) e seis bandas beta ( $\beta$ ). A maioria das bandas de  $\alpha$ -esterase se distribuiu nas regiões de migração mais lenta quando comparadas as bandas de  $\beta$ -esterase. As medidas de distâncias das bandas variaram de 1,0 a 6,1 cm, para a migração das  $\alpha$ -esterase e 2,6 a 7,0 cm, para migração das  $\beta$ -esterase. Similarmente, Lange (2001) indicou as bandas  $\alpha$ -esterase como de migração mais lenta que as  $\beta$ -esterase.

Do total de bandas encontradas, o número de bandas variou de uma a quatro entre os genótipos nos zimogramas que representaram a variabilidade isoenzimática das populações. Não foram observados padrões monomórficos de bandas. O mesmo foi obtido por Yanaka (2002) e por Rivas (2001), em análises de esterases realizadas em acessos de *Bromus auleticus*.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os observados por outros autores, para o mesmo sistema enzimático. Malaviya *et al.* (2005) verificaram um total de 18 bandas de esterase em 25 espécies do gênero *Trifolium*. Bortolini (2008) também detectou um total de 18 bandas de esterase em 47 acessos de trevo branco.

A estimativa de similaridade entre os genótipos de teosinto e de milho, através do índice de Jaccard, apresentou valores de coeficientes de similaridade que variaram entre zero (mínimo) e um (máximo), bem como a similaridade média foi de 0,24. Esse valor de similaridade média entre as populações foi considerado de baixa magnitude, indicando que as mesmas apresentam maior divergência entre elas, para o sistema de esterases.

Segundo Alfenas *et al.* (1991), o índice de similaridade de Jaccard estima a proporção de bandas isoenzimáticas que são compartilhadas entre as

unidades taxonômicas. O mesmo autor indica que Jaccard pode ser utilizado para fenótipos não interpretáveis por locos e alelos.

O dendograma foi dividido no ponto de similaridade média (0,24) e a partir deste ponto, cinco grupos de genótipos foram formados (Figura 6). A análise dos agrupamentos foi útil para identificar a divergência existente entre as populações de teosinto e de milho, estabelecida para o produto da atividade enzimática das esterases. Os genótipos que compõem o dendograma foram numerados da seguinte forma: de 1 a 7 – linhagem de milho P2: 672733; de 8 a 14 – linhagem de milho P5: 672736; de 15 a 35 – teosinto Monte Bonito e de 36 a 64 – teosinto Canguçu.

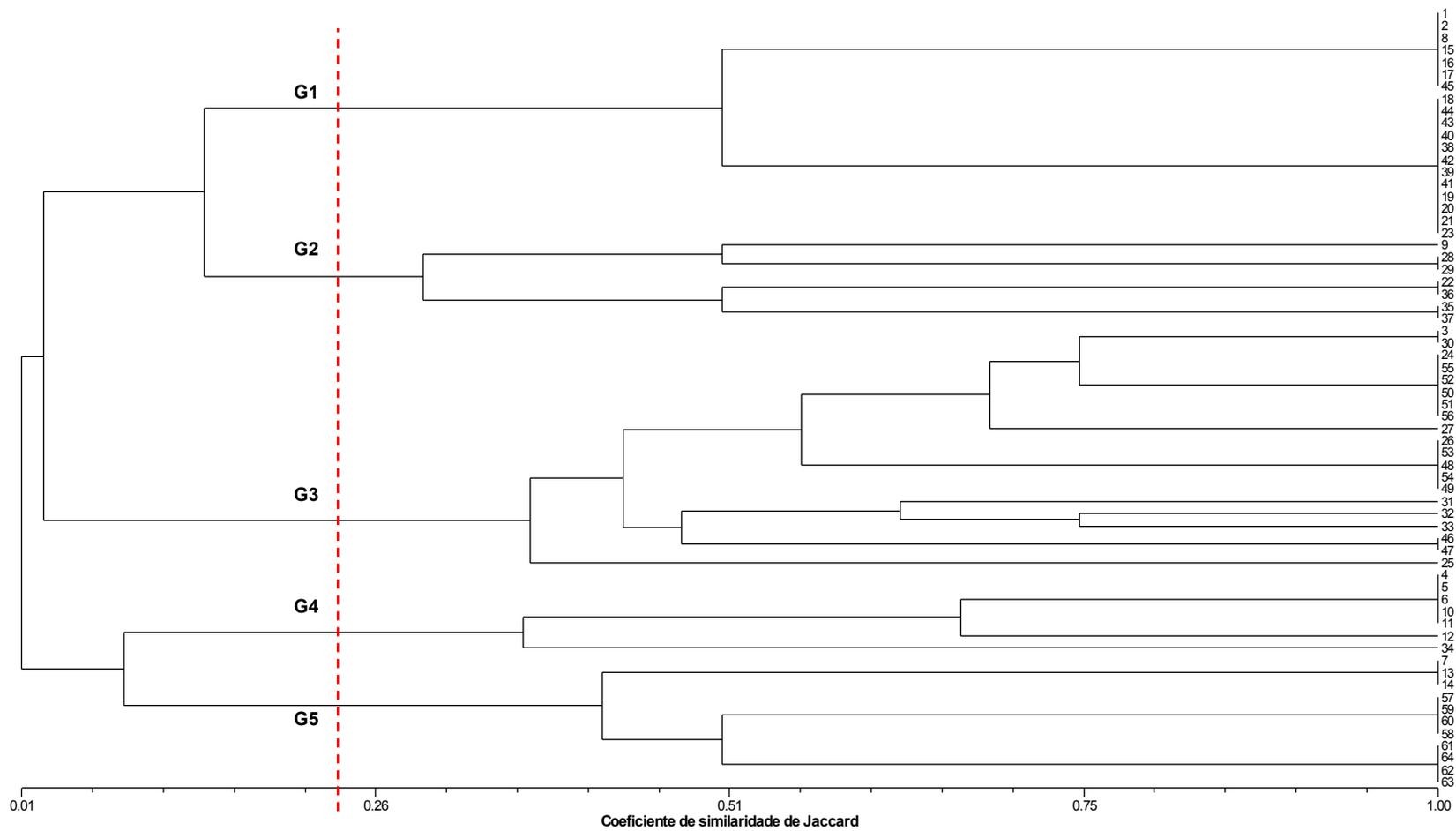


FIGURA 6. Dendrograma obtido pelo coeficiente de similaridade de Jaccard para populações de teosinto e linhagens de milho (P2: 672733 e P5: 672736) utilizadas como testemunhas, a partir de análises de esterases. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.

Os dois maiores grupos formados, grupo 1 e grupo 3 (G1 e G3), foram constituídos por 19 e 20 genótipos, respectivamente. No primeiro grupo ou grupo um (G1) ocorreu o agrupamento de uma mistura de genótipos, sendo que em maior número estão os genótipos de teosinto Monte Bonito, seguidos de teosinto Canguçu e da linhagem de milho P2: 672733. No grupo dois (G2) se encontram a maioria dos genótipos de teosinto Monte Bonito. Da mesma forma que, no grupo três (G3), foram agrupados a maioria dos genótipos de teosinto Canguçu. Os demais grupos apresentaram menor número de genótipos, sendo o quarto grupo (G4) foi composto das linhagens de milho P2: 672733 e P5: 672736. O último grupo formado ou grupo cinco (G5), apresentou a dispersão de genótipos de teosinto Canguçu e da linhagem de milho P2: 672733.

Estes resultados sugerem que, de maneira geral, a similaridade genética para atividade de esterases é maior dentro das populações do que entre elas. Mesmo assim, ocorreu mistura de genótipos dentro dos grupos descritos acima, demonstrando o estreito relacionamento existente entre milho e teosinto.

O coeficiente de correlação ( $r$ ) fonética foi de 0,96, indicando que o dendograma construído através da análise de agrupamentos apresentou uma consistência excelente, quando comparado com os dados da matriz de similaridade. Segundo Pejic *et al.* (1998), o coeficiente de correlação fonética indica o quanto o agrupamento de genótipos no dendograma representa a estimativa da similaridade genética a partir de um determinado marcador.

As atividades metabólicas fundamentais para os organismos são muito similares e, muitas vezes, as enzimas que catalisam reações idênticas podem

ser encontradas em diferentes organismos e/ou em diferentes tecidos, dentro do mesmo organismo (Markert & Moller, 1959). Entretanto, as esterases pertencerem ao metabolismo periférico e, por essa razão, apresentam um grande polimorfismo, possibilitando a caracterização da variabilidade genética.

#### **4.1.3 Análises moleculares**

A caracterização dos níveis de variabilidade e estruturação genética das populações proporciona as bases necessárias para a execução de estratégias adequadas ao aproveitamento dos recursos genéticos por programas de melhoramento, bem como para conservação genética (Rajora, 1999). Nas últimas décadas diversas ferramentas moleculares baseadas na PCR vêm sendo disponibilizadas para utilização em estudos genéticos de populações (Regitano & Coutinho, 2001). Para a escolha do melhor marcador molecular deve ser levada em conta a possibilidade de maximizar o conteúdo de informação por loco e a disponibilidade de marcadores na literatura para a espécie de interesse.

Regiões microssatélites de milho vêm sendo utilizadas com êxito em estudos genéticos e evolutivos de genótipos relacionados como o teosinto (Lubberstedt *et al.*, 1998; Matsuoka *et al.*, 2002a; Vigouroux *et al.*, 2005).

##### **4.1.3.1 Padrão dos microssatélites**

Neste trabalho foram testados 65 locos microssatélites (SSR) de milho em duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito), dos quais 25 locos apresentaram padrão consistente de amplificação e foram utilizados na análise de variabilidade. Dentre 25 locos microssatélites analisados, 88%

apresentaram polimorfismo e 12% apresentaram um único alelo por loco (monomórficos), taxa superior a observada para microssatélites em milho (de 30% a 50%) segundo Wong *et al.*, 2003. Esse resultado confirma a heterogeneidade das populações de teosinto.

Todos os 25 locos microssatélites de milho apresentaram produtos de amplificação para a maioria dos indivíduos dentro das populações de teosinto, bem como os fragmentos possuíam tamanhos alélicos similares àqueles obtidos em populações de milho, em estudos anteriores (Amorin, 2002; Almeida, 2003; Terra, 2004; Wietholter, 2005). Conforme Lübberstedt *et al.* (1998) a aplicação de marcadores microssatélites de espécies cultivadas em espécies silvestres é promissora e pode auxiliar na identificação de regiões de interesse para a cultura no genoma de espécies silvestres ou vice-versa.

Uma possível explicação para esta similaridade na diversidade genética do teosinto com a do milho é a recente origem do milho cultivado a partir do teosinto (aproximadamente, 8000 anos). Neste contexto, Matsuoka *et al.* (2002a) indicaram que milho e teosinto possuem um padrão similar de diversidade genética, considerando o número médio de alelos, e que a maioria dos alelos presentes em milho crioulo (>92%) são comuns ao genoma silvestre.

#### **4.1.3.2 Diversidade genética**

A variação nos perfis microssatélites (SSR) de 42 genótipos de teosinto resultou em 62 alelos em 25 locos analisados, com uma média de 2,5 alelos por loco e uma variação de um a quatro alelos. O tamanho dos alelos identificados variou de 90 a 260 pares de base (pb), conforme demonstrado na

tabela 7. Estes dados foram obtidos de análises realizadas em géis de agarose que, por sua menor resolução, podem subestimar a variabilidade estimada. Resultados semelhantes foram obtidos por Wiethölter *et al.* (2008), que detectaram 60 alelos, com uma média de 2,7 alelos por loco, ao analisar 23 locos microssatélites em milho crioulo.

As populações crioulas possuem importância similar ao germoplasma silvestre do teosinto para fins de melhoramento genético do milho, visto o elevado potencial como fonte de variabilidade genética em ambos (Araújo & Nass, 2002). Além da possibilidade de existência de caracteres de interesse agrônômico ainda não explorados nestes germoplasmas.

Valores similares foram obtidos por Barbosa *et al.* (2003) que encontraram uma variação de dois (2) a cinco (5) alelos em 68 locos SSR testados em 18 linhagens de milho da Embrapa Milho e Sorgo, com uma média de 2,9 alelos por loco. Também Almeida (2003), que analisou genótipos de milho comum, milho doce e de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*), obteve 33 alelos em dez locos microssatélites analisados.

Terra (2004) detectou 57 alelos em 13 locos microssatélites, com uma média de 4,4 alelos por loco, analisados nas mesmas populações. O número superior de alelos detectados para as mesmas populações de milho comum, milho doce e teosinto do último estudo, pode ser resultante da utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida. De forma semelhante, Bered *et al.* (2005) obtiveram média de 4,2 alelos por loco, variando de dois a seis alelos em seis locos microssatélites analisados em populações de milho doce.

Segundo Senior *et al.* (1998) os géis de acrilamida possuem uma maior resolução – detectando diferenças no tamanho alélico de até um par de bases

– enquanto que seqüências com diferenças de dois pares de bases podem não ser detectados em géis de agarose.

Em contrapartida, Matsuoka *et al.* (2002a) obtiveram uma média superior de alelos por loco para teosinto (7,6) e para milho crioulo (5,6), em 42 locos SSR. Kostova *et al.* (2007) também obtiveram uma média superior de alelos por loco SSR (9,1), ao comparar 41 linhagens européias com 10 linhagens americanas, com base na diversidade genética detectada em 18 locos SSR. Entretanto, essa riqueza na diversidade alélica tem sido atribuída, muitas vezes, a maior proporção de seqüências repetitivas dinucleotídicas utilizadas nos SSR (Enoki *et al.*, 2002; Kostova *et al.*, 2007).

A tabela 7 traz o valor médio de PIC (*Polymorphism Information Content* ou conteúdo de informação de polimorfismo), que foi de 0,41 e variou de 0,12 ( $\phi032$ ) a 0,72 (nc004), iniciadores relacionados à síntese da sacarose 1 e álcool desidrogenase 2, respectivamente. Resultados consistentes com os demonstrados por Laborda *et al.* (2004), nos quais ocorreu uma variação de 0,2 a 0,9 para valores de PIC, quando investigados 50 locos microssatélites de populações tropicais de milho. Similarmente, um valor médio de PIC de 0,32 foi descrito por Wiethölter (2005) para microssatélites, apresentando variação de 0,17 a 0,67.

Por outro lado, Reif *et al.* (2003) encontraram valores de PIC de 0,10 a 0,85, com uma média de 0,60, bem como para Patto *et al.* (2004) os valores de PIC variaram de 0,33 a 0,89, com uma média de 0,56.

Valores absolutos de PIC podem indicar o poder discriminatório de locos microssatélites, visto que estão diretamente relacionados à variabilidade da região para os genótipos analisados. No entanto, Warburton *et al.* (2002)

relataram que um maior poder discriminatório nem sempre está relacionado a microssatélites com valores superiores de PIC e que a composição da população é um dos fatores que influencia o poder informativo de um marcador.

TABELA 7. Padrão de 25 locos microssatélites analisados em duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). Locos, número de alelos identificados, tamanho dos alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de cada loco. UFRGS – Porto Alegre, RS, 2008.

| Locos           | Nº de alelos | Tamanho dos alelos<br>(pb)* | PIC         |
|-----------------|--------------|-----------------------------|-------------|
| umc1799         | 04           | 100-150                     | 0,67        |
| phi037          | 01           | 150                         | -           |
| phi021          | 03           | 90-110                      | 0,55        |
| umc1727         | 02           | 150-160                     | 0,43        |
| phi032          | 02           | 225-230                     | 0,12        |
| umc1172         | 02           | 150-155                     | 0,42        |
| umc1594         | 03           | 120-130                     | 0,65        |
| nc004           | 04           | 150-180                     | 0,72        |
| umc1082         | 02           | 90-100                      | 0,15        |
| phi075          | 03           | 250-260                     | 0,55        |
| bnlg439         | 02           | 200-220                     | 0,24        |
| umc1355         | 01           | 150                         | 0,43        |
| umc2047         | 02           | 120-130                     | -           |
| umc1058         | 01           | 100                         | 0,50        |
| umc1016         | 02           | 95-105                      | -           |
| ZmRR1           | 02           | 200-210                     | 0,45        |
| phi080          | 03           | 160-180                     | 0,60        |
| phi027          | 02           | 150-170                     | 0,50        |
| y1SSR           | 02           | 200-210                     | 0,20        |
| umc1309         | 03           | 105-115                     | 0,33        |
| umc1426         | 03           | 140-150                     | 0,64        |
| umc1094         | 04           | 140-170                     | 0,68        |
| umc1576         | 04           | 100-130                     | 0,61        |
| umc1185         | 03           | 170-190                     | 0,35        |
| umc1397         | 02           | 160-180                     | 0,49        |
| Total           | 62           | -                           | -           |
| Média           | 2,48         | -                           | 0,41        |
| Mínimo – Máximo |              | 90-260                      | 0,12 – 0,72 |

\* (pb) = pares de bases

Os 25 pares de iniciadores foram submetidos às estimativas de diversidade genética ( $H_e$ ,  $H_o$ ) e estatística F ( $f$ ,  $\Theta$ ,  $F_g$ ) através do programa

TTPGA (*Tools for Population Genetic Analyses* - Miller, 1997), o qual excluiu três pares de iniciadores ( $\phi$  037, umc1058 e umc1355) das análises.

O conhecimento da distribuição da diversidade genética nas populações é importante para determinar estratégias para conservação deste germoplasma e para a seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento genético (Bered *et al.*, 2005).

Valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e número de alelos de cada loco SSR analisado nas duas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) são demonstrados na tabela 8. Os valores de heterozigosidade observada e esperada, para as duas populações em todos os locos SSR analisados, abrangeram de 0 a 0,81 e de 0 a 0,72, respectivamente.

De maneira geral, os valores de heterozigosidade observada foram inferiores aos de heterozigosidade esperada dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg. No entanto, esses valores poderiam ser os mesmos dentro das expectativas de Hardy-Weinberg. A discrepância poderia ser devida a falha na amplificação de um dos alelos pela PCR ou a estrutura das populações (Fukunaga *et al.*, 2005), igualmente para este estudo.

A população Monte Bonito apresentou valores médios superiores de  $H_o$  (0,29) e  $H_e$  (0,43) em relação à Canguçu  $H_o$  (0,19) e  $H_e$  (0,40). Valores similares de heterozigosidades médias observada (0,20) e esperada (0,44) foram demonstrados por Eschholz *et al.* (2008), em uma análise de populações de milho crioulo provenientes da Suíça. Esses mesmos autores consideram que os valores de heterozigosidade esperada refletem a média de diversidade genética das populações.

Os valores observados neste estudo para a média de heterozigidade esperada foram inferiores quando comparados a valores de 0,85 para o mesmo táxon *Zea mays* subsp. *mexicana* (Fukunaga *et al.*, 2005), 0,62 para linhagens americanas de milho (Patto *et al.*, 2004), 0,69 para linhagens europeias de milho (Kostova *et al.*, 2007) e 0,61 para milho crioulo (Patto *et al.*, 2008).

TABELA 8. Medidas de diversidade genética, obtidas pela análise de 22 locos microsatélites. Número (Nº) de alelos, estimativas da heterozigidade observada (*Ho*) e da heterozigidade esperada (*He*) nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.

| Loco    | Canguçu   |           |           | Monte Bonito |           |           |
|---------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
|         | Nº alelos | <i>Ho</i> | <i>He</i> | Nº alelos    | <i>Ho</i> | <i>He</i> |
| umc1799 | 4         | 0,57      | 0,52      | 4            | 0,53      | 0,59      |
| phi021  | 3         | 0,00      | 0,48      | 3            | 0,50      | 0,59      |
| umc1727 | 2         | 0,30      | 0,26      | 2            | 0,53      | 0,50      |
| phi032  | 2         | 0,00      | 0,17      | 2            | 0,05      | 0,05      |
| umc1172 | 2         | 0,14      | 0,21      | 2            | 0,47      | 0,50      |
| umc1594 | 3         | 0,25      | 0,59      | 3            | 0,55      | 0,66      |
| nc004   | 4         | 0,38      | 0,66      | 4            | 0,81      | 0,72      |
| umc1082 | 2         | 0,00      | 0,24      | 1            | 0,00      | 0,00      |
| phi075  | 3         | 0,00      | 0,32      | 3            | 0,25      | 0,57      |
| bnlg439 | 2         | 0,19      | 0,24      | 2            | 0,17      | 0,24      |
| umc2047 | 2         | 0,28      | 0,41      | 2            | 0,33      | 0,44      |
| umc1016 | 2         | 0,28      | 0,49      | 2            | 0,42      | 0,43      |
| ZmRR1   | 2         | 0,05      | 0,50      | 2            | 0,00      | 0,28      |
| phi080  | 3         | 0,15      | 0,61      | 3            | 0,00      | 0,44      |
| phi027  | 3         | 0,24      | 0,45      | 3            | 0,00      | 0,10      |
| y1SSR   | 2         | 0,05      | 0,21      | 2            | 0,00      | 0,20      |
| umc1309 | 3         | 0,00      | 0,00      | 3            | 0,30      | 0,55      |
| umc1426 | 3         | 0,30      | 0,51      | 3            | 0,47      | 0,64      |
| umc1094 | 4         | 0,38      | 0,67      | 4            | 0,55      | 0,63      |
| umc1576 | 4         | 0,57      | 0,67      | 4            | 0,40      | 0,46      |
| umc1185 | 3         | 0,10      | 0,28      | 3            | 0,07      | 0,47      |
| umc1397 | 2         | 0,00      | 0,43      | 2            | 0,08      | 0,47      |
| Média   | 2,7       | 0,19      | 0,40      | 2,7          | 0,29      | 0,43      |

O número de alelos por loco SSR pode estar subestimado neste estudo, devido à baixa precisão dos géis de agarose para a separação de bandas, onde o número de alelos detectados para cada loco SSR pode ser inferior quando comparado ao número de alelos observados em géis de poliacrilamida.

Labate *et al.* (2003) relataram que a variação no número de indivíduos por amostra (5-23) não resulta em dados significativamente diferentes para variação genética ou para número médio de alelos por loco e indivíduos. Os resultados encontrados neste trabalho suportam esta afirmação e indicam que a distribuição das freqüências alélicas dentro das populações e nos locos analisados apresenta maior contribuição para a média de heterozigosidade.

#### **4.1.3.3 Estruturação das populações e fluxo gênico**

O conhecimento da variabilidade genética é requisito básico para o entendimento da dinâmica evolutiva das populações. Em um programa de melhoramento genético é fundamental o amplo conhecimento das fontes de variabilidade, uma vez que o objetivo seja reunir num só indivíduo ou planta, características de interesse ao melhorista (Muniz *et al.*, 2008).

Com base nos dados obtidos nos 22 locos microssatélites (SSR) selecionados, foi realizada uma análise da estrutura genética das populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito), visando identificar o grau de diferenciação genética entre as mesmas (Tabela 9).

O coeficiente de endogamia é um parâmetro que afeta diretamente a diversidade e resume de forma conveniente a estrutura genética de uma população (Muniz *et al.*, 2008). Wright (1965) determina o significado do coeficiente de endogamia e de parâmetros relacionados a pares de gametas:  $F_{it}$  ou  $F$  - expressa a correlação entre os gametas que se unem para produzir os indivíduos da população total;  $F_{is}$  ou  $f$  - expressa a média das correlações, sendo cada uma delas proveniente dos gametas que se unem em cada

subpopulação e  $F_{st}$  ou  $\Theta$  - expressa a correlação entre os gametas ao acaso dentro da subpopulação em relação aos gametas da população total.

Um coeficiente de endogamia ( $f$ ) moderadamente alto foi encontrado (0,44), quando todos os locos SSR foram combinados e analisados, indicando que forças evolutivas a favor da endogamia estariam atuando sob os alelos (Tabela 9). Esses dados sugerem que ocorreram, preferencialmente, cruzamentos entre indivíduos coespecíficos dentro das populações de teosinto e que os mesmos apresentaram um importante papel na determinação da estrutura genética destas populações. Para Moraes *et al.* (1999), este tipo de cruzamento pode ser provocado pela baixa densidade de plantas determinadas para cada população.

Uma exceção foi obtida em um dos locos microssatélites (umc1727), onde foi encontrado um valor negativo (-0,07), que sugere excesso de heterozigotos ou acasalamento ao acaso.

O grau de diferenciação (média de  $\Theta$ ) entre as populações foi de 0,15, indicando que existe moderada diferenciação genética entre Canguçu e Monte Bonito (Tabela 9). Segundo Wright (1978), um valor de  $\Theta$  igual a zero indica panmixia (cruzamentos ao acaso e sem restrições, entre indivíduos da mesma espécie) e valor de um (1) indica completo isolamento por diferenciação entre as populações.

TABELA 9. Estimativas da estatística F de Wright (1943), obtidas pela análise de 22 locos microssatélites. Coeficiente de endogamia ( $f$ ), grau de diferenciação genética ( $\Theta$ ) e fluxo gênico ( $Nm$ ) nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito). UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.

| Loco    | $f$   | $\Theta$ | $Nm$   |
|---------|-------|----------|--------|
| umc1799 | 0,03  | 0,28     | 0,64   |
| phi021  | 0,56  | 0,03     | -      |
| umc1727 | -0,07 | 0,20     | 1,00   |
| phi032  | 0,79  | -0,01    | -      |
| umc1172 | 0,16  | 0,27     | 0,68   |
| umc1594 | 0,36  | 0,02     | -      |
| nc004   | 0,20  | 0,05     | -      |
| umc1082 | 1,00  | 0,08     | -      |
| phi075  | 0,72  | 0,26     | -      |
| bnlg439 | 0,28  | -0,03    | - 8,58 |
| umc2047 | 0,30  | -0,03    | - 8,58 |
| umc1016 | 0,27  | 0,10     | 2,25   |
| ZmRR1   | 0,94  | 0,18     | -      |
| phi080  | 0,87  | 0,18     | -      |
| phi027  | 0,58  | 0,59     | -      |
| y1SSR   | 0,88  | -0,05    | -      |
| umc1309 | 0,48  | 0,28     | -      |
| umc1426 | 0,34  | 0,10     | 2,25   |
| umc1094 | 0,31  | 0,03     | 8,08   |
| umc1576 | 0,17  | 0,09     | 2,53   |
| umc1185 | 0,75  | -0,02    | -      |
| umc1397 | 0,92  | 0,12     | -      |
| Média   | 0,44  | 0,15     | 0,27   |

A distância genética entre as populações (Nei, 1978) foi de 0,14, sugerindo que, aproximadamente, 14% da diversidade genética se encontram entre as populações de teosinto e que a maior parte (86%) está dentro delas, concordando com os valores de  $\Theta$  para os locos SSR utilizados na análise. Essa variação pode ser usada como recurso genético para fins de melhoramento de milho, visto que genótipos distintos e com características de importância agrônômica podem ser descobertos dentro das populações de teosinto.

Patto *et al.* (2008) encontraram valores inferiores de  $f$  (0,11) e Eschholz *et al.* (2008) encontraram valores superiores de  $f$ , com uma média de 0,58. Entretanto, resultados similares de distância genética foram apresentados em

diferentes estudos com milho, indicando que a maior parte da diversidade genética está dentro das populações (Warburton *et al.*, 2002; Hartings *et al.*, 2008; Patto *et al.*, 2008).

Valores superiores de endogamia ( $f$ ) são surpreendentes para as populações de teosinto, as quais são populações de polinização aberta e fecundação cruzada, preferencialmente. Embora, o isolamento geográfico original destas populações – cuja nomenclatura determina sua origem em municípios distintos do Rio Grande do Sul (Canguçu e Monte Bonito) – seja uma possibilidade de aumento da homozigose. Outra razão que pode causar a um número superior de homozigotos é a assincronia demonstrada entre os períodos reprodutivos destas populações que pode ter levado ao isolamento reprodutivo das mesmas.

Para Moraes *et al.* (1999), a seleção altera as frequências gênicas e genotípicas, e age em concordância com a migração, dispersão e outros processos que geram a estrutura genética, como por exemplo, o isolamento pela distância, que é o principal modelo conceitual para se explicar como ocorrem as subdivisões das grandes populações, de distribuição contínua, e organizadas aleatoriamente.

Em 59% dos locos SSR analisados nas populações Canguçu e Monte Bonito ocorreram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o qual foi atribuído ao excesso de homozigosidade nestes locos. Para Reif *et al.* (2004), o excesso de homozigotos em alguns dos locos SSR analisados pode estar relacionado a diversas causas, tais como: reduzido número de alelos ou desvio de distribuição de frequências alélicas, seleção a favor dos homozigotos, entre outras.

A distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações é uma função da taxa de fluxo gênico ou número de migrantes ( $Nm$ ) entre as mesmas (Hartings *et al.*, 2008). A Tabela 9 traz os valores obtidos para o fluxo gênico estabelecido entre as populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito).

A taxa média de fluxo gênico entre as populações de teosinto foi de 0,27 em nove locos SSR, visto que o valor foi baseado em um cálculo indireto proposto por Slatkin (1995), impossibilitando a utilização de locos SSR que não estivessem de acordo com as expectativas de Hardy-Weinberg. Conforme Moraes *et al.* (1999), um dos métodos mais robustos e confiáveis para a estimativa indireta de fluxo gênico é a partir da obtenção do número de migrantes ( $Nm$ ) através de  $F_{st}$  ou  $\Theta$ .

Neste trabalho, essa taxa indica um reduzido fluxo gênico entre as populações e que parte da diferenciação genética relacionada às populações de teosinto, pode ser devida ao reduzido fluxo de alelos entre elas. Outra causa pode residir no fato de que valores, relativamente baixos, de  $Nm$  indiquem que o fluxo gênico não foi suficiente para evitar uma diferenciação populacional devido à deriva genética. Segundo Slatkin & Barton (1989), valores maiores que um (1) determinam que o fluxo gênico seja suficientemente alto para prevenir uma diferenciação em função da deriva genética.

Segundo a teoria de equilíbrio instável (Wright, 1932), a subdivisão de uma população em pequenos grupos, havendo baixo fluxo gênico entre os mesmos, pode resultar em uma rápida diferenciação genética devido à deriva.

## 4.2 Análise dos cruzamentos dirigidos a partir da viabilidade dos grãos de pólen

A biologia do pólen tem sido assunto de elevado interesse por extenso período, devido a suas implicações para o melhoramento genético de plantas (Johansen & Bothmer, 1994). Entretanto, informações sobre os grãos de pólen dos cereais – o grupo mais importante economicamente dentre os vegetais – são, muitas vezes, fragmentadas.

O estudo dos grãos de pólen fornece subsídios para avaliar o potencial de fertilidade masculina de indivíduos e/ou populações, contribuindo para estudos taxonômicos, evolutivos e para fins de melhoramento genético.

A qualidade do pólen é, muitas vezes, determinada pela estimativa da viabilidade dos grãos de pólen. Existem diversos métodos capazes de estimar a viabilidade do pólen, embora a técnica de coloração por carmim propiônico seja uma das mais utilizadas (Almeida, 2003; Terra, 2004; Wiethölter, 2005; Conterato & Schifino-Wittmann, 2006; Balbinot, 2007; Navarini, 2008), onde é realizada a contagem de grãos completamente corados (viáveis) e grãos parcialmente ou não corados (inviáveis). Heslop-Harrison (1992) considera a coloração com carmim uma técnica eficiente, rápida, pouco onerosa e adequada precisão relativa.

Neste trabalho, foi estimada a viabilidade dos grãos de pólen através do método de coloração por carmim propiônico. No total, foram analisadas 53 inflorescências masculinas (pendões) de milho (*Zea mays* subsp. *mays*), de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) e de populações segregantes obtidas de cruzamentos entre eles ( $F_1$ s e de retrocruzamentos:  $RC_1F_1$ s), sendo que de cada pendão foram feitas três lâminas.

A tabela 10 traz os resultados obtidos para a estimativa de viabilidade dos grãos de pólen nas populações anteriormente citadas. Foram considerados como grãos de pólen com anormalidades os que apresentaram formato irregular, tamanho menor e ausência de coloração (vazios).

TABELA 10. Viabilidade dos grãos de pólen avaliada nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito), nas linhagens de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), nas populações F<sub>1</sub>s e nas populações de retrocruzamento (RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>s), obtidas de cruzamentos entre milho e teosinto. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.

| Genótipos   | Nº de plantas | Nº de células | Viabilidade dos grãos de pólen (%) |
|---|---------------|---------------|------------------------------------|
| Canguçu   | 06            | 3600          | 99,75                              |
| Monte Bonito  | 08            | 4800          | 99,77                              |
| Total   | 14            | 8400          |                                    |
| Média teosinto  |               |               | 99,76                              |
| P2: 672733  | 08            | 3400          | 97,15                              |
| P5: 672736  | 05            | 3000          | 99,30                              |
| P6: 672739  | 03            | 1600          | 99,81                              |
| Total   | 16            | 8000          |                                    |
| Média milho   |               |               | 98,75                              |
| F <sub>1</sub> : P2 x Canguçu                           | 04            | 2400          | 99,96                              |
| F <sub>1</sub> : P5 x Canguçu                           | 05            | 2800          | 98,31                              |
| F <sub>1</sub> : P6 x Monte Bonito                      | 02            | 1200          | 99,83                              |
| Total   | 11            | 6400          |                                    |
| Média F <sub>1</sub> s                                  |               |               | 99,31                              |
| RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : (P2 x Canguçu)xP2      | 05            | 3000          | 99,90                              |
| RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : (P5 x Canguçu)xP5      | 04            | 2400          | 99,95                              |
| RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> : (P6 x Monte Bonito)xP6 | 03            | 1800          | 72,22                              |
| Total   | 12            | 7200          |                                    |
| Média RC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> s                  |               |               | 90,69                              |

Foi observada uma elevada frequência de grãos de pólen viáveis (acima de 90%) para todos os genótipos, sugerindo que as plantas resultantes dos cruzamentos realizados entre milho teosinto não indicavam barreiras reprodutivas que impedissem a formação de grãos de pólen viáveis. Esses valores são semelhantes aos encontrados anteriormente por Almeida (2003), para teosinto (100%), milho (99,7%) e F<sub>1</sub>s (99,3%) e por Terra (2004), para teosinto (100%), milho (99,4%) e F<sub>1</sub>s (96,8%).

As taxas de viabilidade variaram de 72,22% ( $RC_1F_1$ : P6 x Monte Bonito x P6) a 99,96% ( $F_1$ : P2 x Canguçu). Através da viabilidade média foi possível verificar que as populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) apresentaram maior índice de viabilidade (99,75%) e o menor índice foi encontrado para as populações de retrocruzamento (90,69%). No entanto, os valores reduzidos de pólen viáveis observados para as populações de retrocruzamento foram, diretamente, influenciados pelos valores da população  $RC_1F_1$ : (P6 x Monte Bonito) x P6, a qual apresentava anteras com aspecto de degeneração, dificultando a visualização das células.

Estes resultados indicam que as populações analisadas apresentam uma meiose regular, visto que a regularidade na divisão é um pré-requisito para formação de grãos de pólen viáveis (Figura 7).

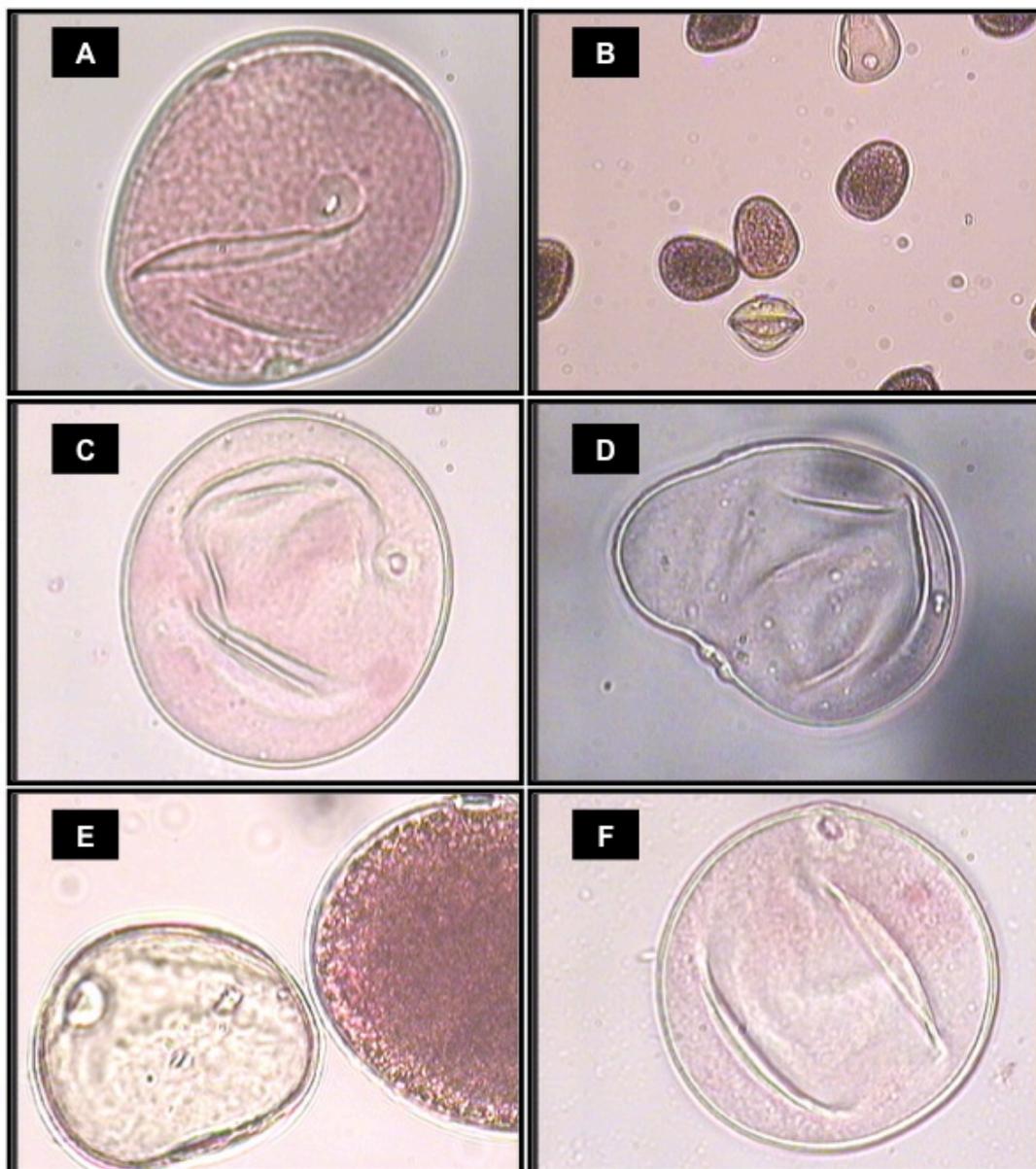


FIGURA 7. Viabilidade dos grãos de pólen. A) pólen de teosinto com formato regular; B) grãos de pólen regulares de teosinto; C) pólen de milho com formato regular; D) pólen de plantas  $F_1$  com formato irregular; E) pólenes regulares de  $RC_1F_1$  e F) pólen regular de  $RC_1F_1$ . Fotos, Terra, T. F. (Escala: 10  $\mu$ m). UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.

A microsporogênese envolve desde a meiose em células mãe de pólen até a formação do pólen maduro e foi extensivamente estudada em milho (Chang & Neuffer, 1989; Defani-Scoarize *et al.*, 1996), sendo que em todas as fases do desenvolvimento é possível ocorrerem anormalidades ocasionadas pelo genótipo e/ou pelo ambiente. Efeitos ambientais como estresse por altas temperaturas, conforme demonstrado por Bodanese-Zanettini *et al.* (1979) em trigo, e a utilização de agrotóxicos (Sereno *et al.*, 1981), podem induzir anomalias meióticas que podem resultar na inviabilidade dos grãos de pólen.

Foi encontrada menor disponibilidade de inflorescências masculinas em fase adequada do desenvolvimento para as plantas pertencentes à linhagem P6: 672739, bem como para os cruzamentos ( $F_1$ : P6 x Monte Bonito) e retrocruzamentos ( $RC_1F_1$ : P6 x Monte Bonito x P6) desenvolvidos com a mesma. A razão para obtenção destes resultados pode estar relacionada à ausência de adaptabilidade desta linhagem aos estresses ambientais ocorridos no ano de 2008, com oscilações entre períodos de excesso de chuvas e de temperaturas elevadas, bem como o número reduzido de plantas analisadas.

Em geral, as inflorescências masculinas apresentavam anteras com coloração amarelada e claras. Foi encontrada dificuldade de avaliação das células nas populações em que as anteras possuíam coloração amarelo-escuras, visto que o material demonstrava aspecto de degeneração. Resultados diferentes foram obtidos por Moraes (2007) em *Hypericum brasiliense*, que caracterizou as anteras claras como macho-estéreis, visualizando a má formação de grãos de pólen através de secções anatômicas das mesmas.

Segundo revisão de Caetano Pereira & Pagliarini (1997), a citomixia (transferência de material genético através de células não gaméticas) pode contribuir para diminuição da viabilidade dos genótipos de milho gerando uma série de outras anomalias, como desvios no número cromossômico e degeneração de meiócitos, entre outras. Estas anormalidades podem resultar em esterilidade parcial por supressão da meiose ou pela formação de produtos desbalanceados na meiose.

O alto índice de grãos de pólen viáveis encontrado nas linhagens de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), nas populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e nas gerações segregantes ( $F_1$ s e de retrocruzamentos:  $RC_1F_1$ s) é compatível com estudos prévios (Almeida, 2003; Terra, 2004), os quais demonstraram meiose regular e índice meiótico acima de 90%.

Por fim, os resultados obtidos sobre a viabilidade dos grãos de pólen confirmam o potencial reprodutivo das populações de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) e de milho (*Zea mays* subsp. *mays*), bem como sugerem que, a dificuldade de manutenção de sucessivas gerações através da produção de sementes, não é devida a barreiras citológicas. Além do que, estes resultados demonstram a similaridade entre seus conjuntos cromossômicos, indicando um estreito relacionamento evolutivo entre milho e teosinto, o qual, entretanto, não contribuiu para o sucesso das hibridações realizadas entre as duas subespécies avaliadas neste estudo (conforme resultados e discussão apresentados a seguir).

### 4.3 Análise dos cruzamentos dirigidos a partir da média de sementes

O questionamento a respeito do fluxo gênico entre milho e teosinto ganha significância adicional na atual situação do meio científico, uma vez que os interesses estão direcionados à possível transmissão de genes entre estes táxons (Ellstrand *et al.*, 2007).

Híbridos espontâneos entre milho (*Zea mays* subsp. *mays*) e teosintos (*Zea mays* subsp. *mexicana* ou *parviglumis*) são extensivamente encontrados em lavouras de regiões onde o ancestral silvestre é abundante (Fukunaga *et al.*, 2005). Entretanto, estudos realizados com cruzamentos manuais indicaram que *Z. mays* subsp. *mexicana* e milho exibem incompatibilidade genética (Evans & Kermicle, 2001; Baltazar *et al.*, 2005), sem resultados significativos.

Dados obtidos de trabalhos anteriores (Almeida, 2003 e Terra, 2004) demonstram que existem barreiras genéticas nas hibridações entre milho e teosinto, principalmente, na formação de populações F<sub>2</sub>. Os experimentos foram instalados em dois locais diferentes – em Eldorado do Sul (RS) e em Recife (PE) – com o objetivo de isolar o fator ambiental e propiciar a produção de sementes F<sub>2</sub>. Em ambos os trabalhos, a germinação da geração F<sub>2</sub> foi extremamente reduzida, impossibilitando o desenvolvimento das plantas até o estágio adulto.

Dentro deste contexto, foi estabelecida uma análise dos cruzamentos dirigidos entre populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) e linhagens de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), neste trabalho.

Das 90 plantas das linhagens de milho (P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739) e 120 plantas das populações F<sub>1</sub>'s (P2 x Canguçu; P5 x Canguçu; P5

x Monte Bonito e P6 x Monte Bonito) semeadas no período agrícola de 2006-2007, na EMBRAPA – Clima Temperado, em Pelotas (RS), foram realizados aproximadamente, 25 cruzamentos dirigidos, que resultaram em 275 sementes da primeira geração de retrocruzamento (Tabela 11). Para o mesmo número de sementes semeadas na EEA – UFRGS, em Eldorado do Sul (RS), uma média de 14 cruzamentos foram realizados, com obtenção de 29 sementes das populações de  $RC_1F_1$ 's.

Resultados contrários foram encontrados em Pelotas (RS), quando as mesmas populações foram mantidas sob polinização espontânea, sendo que o número de sementes resultantes chega a ser maior do que o triplo obtido via polinização manual, concordando com dados apresentados por Fukunaga *et al.* (2005) e Ellstrand *et al.* (2007).

TABELA 11. Estimativa da compatibilidade dos cruzamentos entre milho e teosinto para obtenção de populações de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ 's), realizados em Pelotas e em Eldorado do Sul, RS. 2007.

| <b>Pelotas</b>                     |                      |                             |
|------------------------------------|----------------------|-----------------------------|
|                                    | Média de cruzamentos | Média de sementes $RC_1F_1$ |
| F <sub>1</sub> : P2 x Canguçu      | 7                    | 150                         |
| F <sub>1</sub> : P5 x Canguçu      | 7                    | 35                          |
| F <sub>1</sub> : P5 x Monte Bonito | 5                    | 60                          |
| F <sub>1</sub> : P6 x Monte Bonito | 6                    | 30                          |
| Total                              | 25                   | 275                         |
| <b>Eldorado do Sul</b>             |                      |                             |
| Populações                         | Média de cruzamentos | Média de sementes $RC_1F_1$ |
| F <sub>1</sub> : P2 x Canguçu      | 3                    | -                           |
| F <sub>1</sub> : P5 x Canguçu      | 3                    | 4                           |
| F <sub>1</sub> : P5 x Monte Bonito | 4                    | -                           |
| F <sub>1</sub> : P6 x Monte Bonito | 4                    | 25                          |
| Total                              | 14                   | 29                          |

Para realização de autofecundações nos  $RC_1F_1$  foram semeadas 30 sementes das populações  $RC_1F_1$ 's ( $RC_1F_1$ : P2xCanguçux P2,  $RC_1F_1$ : PxCanguçux P5 e  $RC_1F_1$ : P6xMonte Bonitox P6) no período agrícola de 2007-

2008, em Porto Alegre (RS). Foram realizados, aproximadamente, 16 cruzamentos dirigidos, que resultaram em 555 sementes de  $RC_1F_2$ 's (Tabela 12).

TABELA 12. Estimativa da compatibilidade dos cruzamentos entre milho e teosinto para obtenção de populações de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ 's e  $RC_1F_2$ 's), realizados em Porto Alegre, RS. 2008.

| Populações                         | Média de cruzamentos | Média de sementes $RC_1F_2$ |
|------------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| $RC_1F_1$ : (P2xCanguçu) x P2      | 10                   | 370                         |
| $RC_1F_1$ : (P5xCanguçu) x P5      | 1                    | 99                          |
| $RC_1F_1$ : (P6xMonte Bonito) x P6 | 5                    | 86                          |
| Total                              | 16                   | 555                         |
| Populações                         | Média de cruzamentos | Média de sementes $RC_1F_1$ |
| $F_1$ : P2 x Canguçu               | 6                    | -                           |
| $F_1$ : P5 x Canguçu               | -                    | -                           |
| $F_1$ : P6 x Monte Bonito          | -                    | -                           |
| Total                              | 6                    | -                           |

Visando aumentar o número de sementes das populações de retrocruzamento ( $RC_1F_1$ 's) obtidas no ano anterior, foram semeadas 105 sementes da população  $F_1$ : P5 x Canguçu e 75 sementes da linhagem P5: 672736 e realizados, aproximadamente, seis cruzamentos, sem obtenção de sementes  $RC_1F_1$  (Figura 8). Para as demais populações  $F_1$ 's ( $F_1$ : P2 x Canguçu e P6 x Monte Bonito) e linhagens de milho (P2: 672733 e P6: 672739) foram semeadas 30 sementes de cada, sem a viabilização de nenhum cruzamento. Nos dois casos, foi constatada ausência de gametas masculinos, provavelmente, devido às elevadas temperaturas registradas no período reprodutivo destas populações.

De maneira geral, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os relatos de incompatibilidade entre *Zea mays* subsp. *mexicana* e milho (Szabó & Burr, 1996; Evans & Kermicle, 2001; Fukunaga *et al.*, 2005; Ellstrand *et al.*, 2007) .



FIGURA 8. Sementes resultantes dos cruzamentos dirigidos entre milho e teosinto. A)  $RC_1F_2$ : (P2xCanguçu) x P2; B)  $RC_1F_2$ : (P6xMonte Bonito) x P6; C)  $RC_1F_2$ : (P5xCanguçu) x P5 e D)  $RC_1F_1$ : (P5xCanguçu) x P5. Fotos: Terra, T. F. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.

É fato também que as hibridações foram dificultadas por estresse ambiental sendo que, para alguns genótipos, foram impossibilitadas (Tabela 12). O desenvolvimento reprodutivo foi afetado pela incidência de temperatura elevada, intercalada por períodos de níveis pluviométricos acima do normal. Bodanese – Zanettini *et al.* (1979) observaram que, em cultivares de trigo, choques de temperatura elevada durante o período meiótico de desenvolvimento podem inviabilizar a formação de gametas, bem como, ocasionar em uma completa supressão do processo meiótico.

Também foi observada uma assincronia entre os genótipos em estágio reprodutivo, embora os mesmos tenham sido semeados em épocas diferenciadas, a fim de viabilizar os cruzamentos dirigidos. Além do que,

ocorreram danos significativos provocado pela lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) em muitos genótipos (Figura 9). As inflorescências masculinas (pendões) foram totalmente destruídas pela lagarta, a qual se alimenta das folhas centrais e, em maiores infestações, inclusive do pendão. Estas podem ser outras razões para restringir o sucesso das polinizações manuais.

No entanto, é correto afirmar que existe um mecanismo de incompatibilidade genética entre os cruzamentos realizados com milho e teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*), principalmente na formação de gerações segregantes e a partir de F<sub>1</sub>'s. Os dados obtidos anteriormente (Almeida, 2003 e Terra, 2004) corroboram com esta afirmativa, visto que mesmo em ambientes mais homogêneos, foi possível detectar dificuldades na obtenção de gerações segregantes.



FIGURA 9. Demonstração do ataque da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) a lavoura de milho. A) e B) pendões totalmente destruídos. Fotos: Terra, T. F. UFRGS – Porto Alegre, RS. 2008.

Ellstrand *et al.*, 2007 definem a incompatibilidade dos cruzamentos como assimétrica, pois tende a ser mais forte quando o milho desempenha o papel de doador de pólen. Entretanto, considerando o número de cruzamentos efetuados e a média de sementes que podem ser obtidas em milho, os cruzamentos relatados anteriormente demonstraram elevada incompatibilidade, mesmo utilizando o teosinto como doador de pólen.

Por fim, milho e teosinto continuam coexistindo como subespécies distintas a milhares de anos, embora apresentem estreito relacionamento genético. É correto afirmar que os mecanismos genéticos e as forças evolutivas que atuam sobre esta incompatibilidade fornecem vantagens na individualização destes táxons. No entanto, segundo Baltazar *et al.* (2005), permanecem as questões sobre o grau e a direção deste fluxo gênico, bem como os fatores que influenciam a polinização de ambos.

Os resultados apresentados neste estudo complementam aqueles obtidos em investigações anteriores e sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados para a elucidação e entendimento destas importantes barreiras genéticas ocorridas em subespécies do gênero *Zea*.

## 5 CONCLUSÕES

As populações de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) apresentaram variabilidade genética em relação às análises morfológicas, bioquímicas e moleculares, indicando elevado potencial como recurso genético para o melhoramento de milho (*Zea mays* subsp. *mays*).

Os marcadores fenotípicos, isoenzimáticos e moleculares demonstraram eficiência na detecção de variabilidade, indicando o relacionamento genético entre as populações de teosinto, em função da similaridade e distância genética existente entre as mesmas e em relação ao milho.

O germoplasma de teosinto, de milho e das populações segregantes, obtidas de cruzamentos interespecíficos, apresentaram elevada viabilidade nos grãos de pólen, sugerindo regularidade nas divisões meióticas e indicando ausência de barreiras citológicas entre os dois táxons.

Os cruzamentos dirigidos entre milho e teosinto indicam incompatibilidade entre os genomas, visto que houve reduzida formação de sementes, indicando barreiras genéticas que vão além do estreito relacionamento existente entre as duas subespécies.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABOTT, A. G.; AINSWORTH, C. C.; FLAVELL, R. B. Characterization of anther differentiation in cytoplasmic male sterile maize using a specific isozyme system (esterase). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 67, n. 5, p. 469-473, 1984.

AINSWORTH, C. C.; GALE, M. D.; BAIRD, S.. The genetic control of grain esterases in hexaploid wheat. 1. Allelic variation. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 68, n. 3, p. 219-226, 1984.

ALFENAS, A. C. et al **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242 p.

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

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

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

AMORIN, E. et al. Genetic variability in sweet corn using molecular markers. **Maydica**, Bergamo, v. 48, n. 3, p. 177-181, 2003.

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

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

ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

BALBINOT JUNIOR, N. D. **Variabilidade citogenética em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BALLVE, R. M. L. et al. Methodology for starch gel electrophoresis and protocols for isozymes of 32 plant genera. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 491-502, 1995.

BALTAZAR, B. M. et al. Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in Mexico. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, n. 3, p. 519-526, 2005.

BARBOSA, A. M. M. et al. Relationship of intra and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 130, n. 1, p. 87-99, 2003.

BEAVIS, W. D. et al. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their association with qualitative genetic loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 83, n. 2, p. 141-145, 1991.

BEAVIS, W. D. et al. Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F<sub>4</sub> progeny from maize. **Crop Science**, Madison, v. 34, n.4, p. 882-896, 1994.

BENCHIMOL, L. L. et al. 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](http://www.sbmp.org.br/cbmp2001/area5/05resumo150.htm). Acesso: 22/03/2003.

BENIN, G. et al. Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 657-662, 2003.

BERED, F.; BARBOSA-NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BERED, F.; BARBOSA-NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Genetic variability in wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm revealed by RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, n. 4, p. 499-506, 2002.

BERED, F. et al. Genetic variation among and within sweet corn populations detected by RAPD and SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 4, p. 418-425, 2005.

BODANESE-ZANETTINI, M. H. et al. Cytogenetic studies in two brazilian wheat cultivars under natural and controlled temperature conditions. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 551-557, 1979.

BOMMERT, P. et al. Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 69–78, 2005.

BORTOLINI, F. **Análise da diversidade genética e avaliação de características morfofisiológicas associadas a tolerância a seca em diferentes genótipos de trevo branco (*Trifolium repens* L.)**. 2008. 198 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BRACHTVOGEL, E. L. **Densidades e arranjos populacionais de milho e componentes agrônômicos**. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

BRAMMER, S. P. **Variabilidade isoenzimática em populações naturais de *Hordeum stenostachys* (Poaceae)**. 1993. 264 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

BROWN, W. L.; GOODMAN, M. M. Races of corn. In: SPRAGUE, G. F. (Ed.). **Corn and corn improvement**. Madison: America Society of Agronomy, 1977. p. 49-88.

BROWN, A. H. D.; WEIR, B. S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANSKEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding: Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 219-239

BUCKLER, E. S.; STEVENS, N. M. Maize origins, domestication, and selection. In: MOTLEY, T. J.; ZEREGA, N.; CROSS, H. (Eds.). [s.t.], New York: Columbia, 2006. p. 67-90.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA, 2001. 282 p.

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

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

CAVALLI, S. S. Polimorfismos moleculares. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Orgs.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 311-332.

CAVALLI, S. S.; WINGE, H. Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Orgs.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 311-332.

CHANG, M. T.; NEUFFER, M. G. Maize microsporogenesis. **Genome**, Ottawa, v. 32, n. 2, p. 232-244, 1989.

COIMBRA, J. L. M. et al. Criação de variabilidade genética no caráter estatura de planta em aveia: hibridação artificial x mutação induzida. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 273-280, 2004.

COLLINS, W. J. et al. Identification of subterranean clover cultivars and their relationships by isozyme analysis. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 35, n. 3, p. 399-411, 1984.

CONTERATO, I. F.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. New Chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in american taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. **Botanic Journal of the Linnean Society**, Oxon, v. 150, n. 2, p. 229-240, 2006.

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

DOEBLEY, J. F.; ILTIS, H. H. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa. **American Journal of Botany**, Sant Louis, v. 67, p. 982-993, 1980.

DOEBLEY, J. The taxonomy and evolution of tripsacum and teosinte, the closest relatives of maize. In: INSTITUTE MAIZE VIRUS DISEASE COLLOQUIUM AND WORKSHOP, 1983, Ohio. **Proceedings...** Ohio: Ohio Agriculture Research Development Center, 1983. p. 15-28.

DOEBLEY, J. et al. Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae). **Systematic Botany**, Durham, v. 9, p. 203-218, 1984.

DOEBLEY, J. et al. Patterns of isozyme variation between maize and mexican annual teosinte. **Economic Botany**, New York, v. 41, n. 2, p. 234-246, 1987.

DOEBLEY, J. et al. The origin of cornbelt maize: the isozyme evidence. **Economic Botany**, New York, v. 42, n. 1, p.120-131, 1988.

DOEBLEY, J. et al. Genetic and morphological analysis of maize-teosinte F<sub>2</sub> population: implications for the origin of maize. **Proceedings National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 87, n. 24, p. 9888-9892, 1991.

DOEBLEY, J. Genetics, development and the evolution of maize. **Maize Genetics Conference Abstracts**, [S.l.], v. 35, p. 1, 1993.

DOEBLEY, J.; STEC, A. Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: comparison of results for two F<sub>2</sub> populations. **Genetics**, Baltimore, v. 134, n. 2, p. 559-570, 1993.

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

DOEBLEY, J.; STEC, A.; HUBBARD, L. The evolution of apical dominance in maize. **Nature**, London, v. 386, n. 6624, p. 485-488, 1997.

DOEBLEY, J. The genetics of maize evolution. **Annual Review of Genetics**, Madison, v. 38, [s.n.], p. 37-59, 2004.

DOEBLEY, J.; GAUT, B. S.; SMITH, B. D. The molecular genetics of crop domestication. **Cell**, Cambridge, v. 127, n. 7, p. 1309-1321, 2006.

DUBREUIL, P.; CHARCOSSET, A. Genetic diversity within and among maize populations: a comparison between isozyme and nuclear RFLP loci. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 5, p.577-587, 1998.

EDWARDS, M. D. et al. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. IV. Analysis based on genome saturation with isozyme and restriction fragment length polymorphism markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 83, n. 6-7, p. 765-774, 1992.

ELLSTRAND, N. C. et al. Spontaneous hybridization between maize and teosinte. **Journal of Heredity**, Cary, v. 98, n. 4, p. 183-187, 2007.

ENOKI, H.; SATO, H.; KOINUMA, K. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, n. 8, p. 1270-1277, 2002.

ENOKI, H.; MIKI, K.; KOINUMA, K. Mapping of quantitative trait loci associated with early flowering of a northern flint maize (*Zea mays* L.) inbred line. **Maydica**, Bergamo, v. 51, n. 3-4, p. 515-523, 2006.

ESCHHOLZ, T. W. et al. Genetic diversity of Swiss maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) assessed with individuals and bulks on agarose gels. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, n. 7, p. 971-983, 2008.

EVANS, M. M. S.; KERMICLE, J. L. *Teosinte crossing barrier1*, a locus governing hybridization of teosinte with maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, n. 2-3, p. 259-265, 2001.

EYRE-WALKER, A. et al. Investigation of bottleneck leading to the domestication of maize. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 8, p. 4441-4446, 1998.

FEDERIZZI, L. C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e

possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 3-15.

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

FUKUNAGA, K. et al. Genetic diversity and population structure of teosinte. **Genetics**, Baltimore, v. 169, n. 4, p. 2241-2254, 2005.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. São Paulo: USP, 1992. 631 p.

GALINAT, W. C. The origin of maize. **Annual Review of Genetic**, Palo Alto, v. 5, p. 447-478, 1971.

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

GALINAT, W. C. The missing links between teosinte and maize: a review. **Maydica**, Bergamo, v. 30, n. 2, p. 137-160, 1985.

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

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

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

GILL, B. S.; FRIEBE, B. Plant cytogenetics at the dawn of the 21<sup>st</sup> century. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 2, p. 109-115, 1998.

GILLESPIE, J. H.; LANGLEY, C. H. A genera model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, Austin, v. 76, n. 4, p. 837-848, 1974.

GOLDMAN, I. L.; ROCHEFORD, T. R.; DUDLEY, J. W. Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois long term selection maize strains. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 87, n. 1-2, p. 217-224, 1993.

GOLOUBINOFF, P.; PAABO, S.; WILSON, A. C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *adh2* gene segment from archaeological specimens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Berkeley, v. 90, n. 5, p. 1997-2001, 1993.

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

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

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

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

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2. ed. Ames: Iowa State University, 1988. 468 p.

HARTINGS, H. et al. Assessment of genetic diversity and relationships among maize (*Zea mays* L.) italian landraces by morphological traits and AFLP profiling. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 6, p.831-842, 2008.

HEIDRICH-SOBRINHO, E. Isoenzimas como marcadores genéticos na identificação de nove linhagens de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 281-286, 1982.

HESLOP-HARRISON, J. S. Cytological techniques to assess pollen quality. In: CRESTI, M.; TIEZZE, A. (Orgs.). **Sexual plant reproduction**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 41-57.

HILTON, H.; GAUT, B.S. Speciation and domestication in maize and its wild relatives: evidence from the *Globulin-1* gene. **Genetics**, Baltimore, v. 150, n. 2, p. 863-872, 1998.

HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. Pollen selection. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 83, n. 6-7, p. 663-672, 1992.

JASIENIUK, M.; MAXWELL, B. D. Plant diversity: new insights from molecular biology and genomics technologies. **Weed Science**, Lawrence, v. 49, n. 2, p.257-265, 2001.

JOHANSEN, B.; VONBOTHMER, R. Pollen size in *Hordeum* L.: correlation between size, ploidy level and breeding system. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 7, n. 5, p. 259-263, 1994.

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

KATO, T. A. Chromosome morphology and the origin of maize and its races. **Evolutionary Biology**, New York, v. 17, p. 219–253, 1984.

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

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 49-63, 2002.

KOSTOVA, A. R. et al. Assessing the genetic diversity of Bulgarian maize germplasm using microsatellite markers. **Maydica**, Bergamo, v. 52, n. 3, p. 251-255, 2007.

LABATE, J. A. et al. Molecular and historical aspects of corn belt dent diversity. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 1, p. 80-91, 2003.

LACADENA, J. R. **Citogenética**. Madrid: Editorial Complutense, 1996. 464 p.

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

LABORDA, P. R. et al. Diversidade genética entre linhagens de milho tropical: comparação entre marcadores AFLP e Microssatélites. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25, 2004, Cuiabá. **Resumos...** Sete Lagoas: ABMS: EMBRAPA Milho e Sorgo: Empaer, 2004. Disponível em CDROM.

LABORDA, P. R. et al. Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 111, n. 7, p. 1288-1299, 2005.

LANGE, O. **Caracterização isoenzimática de oito espécies do gênero *Trifolium* L. ocorrentes no Rio Grande do Sul**. 2001. 182 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

LANGE, O.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Isozyme variation in wild and cultivated species of the genus *Trifolium* L. (Leguminosae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 339-345, 2000.

LAUTER, N.; DOEBLEY, J. Genetic variation for phenotypically invariant traits detected in teosinte: implications for the evolution of novel forms. **Genetics**, Baltimore, v. 160, n. 1, p. 333-342, 2002.

LI, Y. C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxon, v. 11, n. 12, p. 2453-2465, 2002.

LI, Y. et al. The genetics relationships among plant-height traits found using multiple trait QTL mapping of a dent corn and popcorn cross. **Genome**, Toronto, v. 50, n. 4, p. 357-364, 2007.

LI, Y. L. et al. Identification of agronomically favorable quantitative trait loci alleles from a dent corn inbred Dan232 using advanced backcross QTL analysis and comparison with the F<sub>2:3</sub> population in popcorn. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2008.

LIU, F. et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. **Plant Cell**, Dordrecht, v. 13, n. 5, p. 1063-1078, 2001.

LIU, K. J. et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics**, Baltimore, v. 165, n. 4, p. 2117-2128, 2003.

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).

LU, H.; BERNARDO, R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, n. 4, p. 613-617, 2001.

LÜBBERSTEDT, T.; DUSSLE, C.; MELCHINGER, A. E. Application of microsatellites from maize to teosinte and other relatives of maize. **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, n. 5, p. 447-450, 1998.

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

MALAVIYA, D. R. et al. Estimation of variability of five enzyme systems among wild and cultivated species of *Trifolium*. **Genetic Resource and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 52, n. 7, p. 967-976, 2005.

MALUF, M. P. et al. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR markers systems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 366-373, 2005.

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

MANGELSDORF, P. C. The mystery of corn: new perspectives. **Proceedings American Philosophical Society**, Philadelphia, v. 127, n. 4, p. 215-247, 1983.

MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 45, [s. n.], p. 753-763, 1959.

MATSUOKA, Y. et al. Microsatellites in *Zea* – variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. **Theoretical and Applied Genetics**, New

York, v. 104, n. 2-3, p. 436-450, 2002a.

MATSUOKA, Y. et al. 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, 2002b.

MELCHINGER, A. E. et al. Relationships among european barley germoplasms: I. Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 5, p. 1191-1199, 1994.

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

MIGLANI, G. S. **Dictionary of plant genetics and molecular biology**. New York: The Food Products, 1998. 348 p.

MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: Ed. Autor, 1998. p. 141.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA), versão 1.3**: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Arizona: Microsoft Corporation, 1997. Disponível em: <http://www.public.asu.edu>. Acesso em: 18/02/2009.

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

MORAES, I. C. R. **Caracterização citogenética e da biologia reprodutiva de três espécies do gênero *Hypericum* L. (Clusiaceae)**. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

MORAES, P. L. R. et al. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2 (suplemento), p. 237-248, 1999.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. **Citogenética**. In: OSÓRIO, E. A. Trigo no Brasil. Campinas: Fundação Cargill, 1982. p. 620.

MORO, J. R.; SILVEIRA, F. T.; CARGNELUTTI FILHO, A. Dissimilaridade genética em sessenta e quatro linhagens de milho avaliadas para resistência ao complexo enfezamento. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 7, n. 1. p. 153-160, 2007.

MOTTA, W. A.; MAIA, M. S. Condições para o teste de germinação de sementes de teosinto (*Zea mexicana* Schrader). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 21, n. 1, p. 264-268, 1999.

MUNIZ, J. A. et al. Métodos de estimação do coeficiente de endogamia em uma população diplóide com alelos múltiplos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 93-102, 2008.

MURRAY, M; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Stanford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NAVARINI, A. P. G. **Caracterização citogenética de populações de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schldl. (Clusiaceae) em comparação com outras espécies do gênero**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

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

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. **Aspectos Genéticos e Moleculares da Produção Vegetal**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2000. p. 25-38.

OLIVEIRA, H. A. **Padrões eletroforéticos e genética de isoenzimas na identificação de cultivares e linhagens *Pisum sativum* L. e sua utilização no melhoramento genético**. 136 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1976.

OLIVEIRA, M. do S. P. et al. Diversidade genética entre acessos de açaizero baseada em marcadores RAPD. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 31, n. 6, p.1645-1653, 2007.

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

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

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose vegetal: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADA A RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 2.,2004, Brasília. **Anais...**Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 24-41.

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

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

PATTO, M. C. V. et al. Assessing the genetic diversity of portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 63-72, 2004.

PATTO, M. C. V. et al. Genetic diversity evolution through participatory maize breeding in Portugal. **Euphytica**, Dordrecht, v. 161, n. 1-2, p. 283-291, 2008.

PEJIC, I. et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 8, 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, C. L. M.; NARANGO, C. A. Meiotic behavior among plants of an alloplasmic lines of maize. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 5, p. 723-729, 1997.

POGGIO, L. et al. 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.

POZZOBON, M. T. **Caracterização citogenética de acessos de germoplasmas de espécies silvestres e semidomesticadas do gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. 2005. 152 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

POZZOBON, M. T.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; BIANCHETTI, L. B. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do  $x=12$  and  $x=13$  represent two evolutionary lines? **Botanic Journal of the Linnean Society**, London, v. 151, n. 2, p. 259-269, 2006.

RAJORA, O. P. Molecular biology in sustainable forest management. In: SPINEL, S.; RITTER, E. (Ed.). **Proceedings of application os biotechnology to forest genétics: BIOFOR 99**. Madrid: Vitoria-Gasteiz, 1999. p. 29-39.

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

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

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

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

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasília: **Embrapa informação tecnológica**, 2001. 215 p.

REIF, J. C. et al. Genetic distance on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 4, p. 1275-1282, 2003.

REIF, J. C. et al. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical and temperate germoplasm by SSR markers. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 6, p. 326-334, 2004.

REIF, J. C. et al. Genetic structure and diversity of european flint maize populations determined with SSR analyses of individuals and bulks. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 111, n. 5, p. 906-913, 2005.

REIF, J. C. et al. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 113, n. 2, p. 177-185, 2006.

RELWANI, L. L. Teosinte (*Euclaena mexicana* Schrad.) a fodder crop of warm and humid tropics. **Indian Dairyman**, Nova Dehli, v. 20, n. 2, p.61-6, 1968.

RIVAS, M. Sistema reproductivo y estructura genética de poblaciones de *Bromus auleticus* Trinius ex – Nees (Poaceae). Estudio mediante isoenzimas. **Agrociencia**, Montevideo, v. 5, n. 1, p. 32-40, 2001.

RODRIGUEZ-GARAY, B.; BARROW, J. R. Pollen selection for heat tolerance in cotton. **Crop Science**, Madison, v. 28, n. 5, p. 857-859, 1988.

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

SANCHEZ G., J. J. et al. **Distribución y Caracterización del Teosinte**. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 1998. Não paginada.

SANCHEZ G., J. J. et al. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. **Economic Botany**, New York, v. 54, n. 1, p. 43-59, 2000.

SANCHEZ G., J. J. et al. Isozyme and morphological variation in maize of five Andean countries. **Maydica**, Bergamo, v. 51, n. 1, p. 25-42, 2006.

SANCHEZ G., J. J. et al. Racial diversity of maize in Brazil and adjacent áreas. **Maydica**, Bergamo, v. 52, n. 1, p. 13-30, 2007.

SANGOI, L. et al. Bases morfofisiológicas para maior tolerância dos híbridos modernos de milho a altas densidades de plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 101-110, 2002.

SANTOS, R. C. et al. Classificação de genótipos de amendoim baseada nos descritores agromorfológicos e isoenzimáticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2000.

SARI-GORLA, M. Sporophytic response to pollen selection for Alachlor tolerance in maize. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 88, n. 6-7, p. 812-817, 1994.

SAS Institute. System for Information. Version 8. Cary, 1999. 1 CD-ROM.

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

SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a reviews. **Biochemical Genetics**, New York, v. 3, n.1, p. 37-79, 1969.

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.

SENIOR, M. L. et al. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using na agarose gel system. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 1088-1098, 1998.

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

SIBOV, S. T. et al. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2. Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. **Hereditas**, Copenhagen, v. 139, n. 2, p.107-115, 2003.

SIMPSON, M. J. A.; WITHERS, L. A. Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis: a guide to the literature. In: **International Board for Plant Genetic Resources**. Roma: [s.n.], 1986. 102 p.

- SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 391 p.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Baltimore, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995.
- SLATKIN, M; BARTON, N. H. A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, Lawrence, v. 43, n. 7, p. 1349-1368, 1989.
- SMITH, G. A.; MOSER, H. S. Sporophytic-gametophytic herbicide tolerance in sugarbeet. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 71, n. 2, p. 231-237, 1985.
- SMITH, J. S. C.; SMITH, O. S. Associations among inbred lines of maize using electrophoretic, chromatographic, and pedigree data. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 76, p. 39-44, 1988.
- SMITH, O. S. et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F<sub>1</sub> grain yield, heterosis, and RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 80, n. 6, p. 833-840, 1990.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. **The Biochemical Journal**, London, v. 61, n. 4, p. 629-640, 1955.
- STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> centuries. **Taxon**, Berlin, v. 49, n. 3, p. 451-477, 2000.
- STEBBINS, G. L.; CRAMPTON, B. A suggested revision of the grass genera of temperate North America. **Recent Advances in Botany**, v. \_\_, p. 133-145, 1961.
- STEBBINS, G.L. **Variation and evolution in Plants**. Columbia University Press. New York, 1951. 643 p.
- STEBBINS, G. L. **Processos de Evolução Orgânica**. São Paulo: Polígono, 1970. 252 p.
- STEBBINS, G. L. Introduction. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. **Isozymes in Plant Biology**. London: Chapman e Hall, 1990. p. 1-4.
- STUBER, C. W.; EDWARDS, M. D.; WENDEL, J. F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its components traits. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 4, p. 639-648, 1987.
- SWARUP, S. et al. Determinants of the high-methionine trait in wild and exotic germplasm may have escaped selection during early cultivation of maize. **Plant Journal**, Oxon, v. 8, n. 3, p. 359-368, 1995.

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

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

SZABÓ, V. M.; BURR, B. Simple inheritance of key traits distinguishing maize and teosinte. **Molecular General & Genetics**, New York, v. 252, n. 1-2, p. 33-41, 1996.

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

TAKAHASHI, C. et al. Genomic relationships between maize and its wild relatives. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 6, p. 1201-1207, 1999.

TANKSLEY, S. D.; RICK, C. M. Genetics of esterases in species of *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 56, n. 5, p. 209-219, 1980.

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

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

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. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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

VIEIRA, E. A. et al. Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by RAPD. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 407-413, 2004.

VIEIRA, E. A. et al. Emprego de modelos gráficos na seleção de genitores de milho para hibridização e mapeamento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 986-994, 2005.

VIGOUROUX, Y. et al. Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication.

**Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 15, p. 9650-9655, 2002.

VIGOUROUX, Y. et al. An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. **Genetics**, Baltimore, v. 169, n. 3, p. 1617-1630, 2005.

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

WANG, C. L. et al. Genetic analysis of photoperiod sensitivity in a tropical by temperate maize recombinant inbred population using molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 117, n. 7, p. 1129-1139, 2008.

WARBURTON, M. L. et al. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 1832-1840, 2002.

WARBURTON, M. L. et al. Genetic diversity in CIMMYT nontemperate maize germplasm: landraces open pollinated varieties, and inbred lines. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 2, 2008.

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

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

WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; LU, J. Identifying and mapping genes of economic significance. **Euphytica**, Dordrecht, v. 73, p. 191-198, 1994.

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. **Isozymes in plant biology**. London: Chapman & Hall, 1990. p. 46-72.

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

WHITE, S. E.; DOEBLEY, J. Of genes and genomes and the origin of maize. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 327-332, 1998.

WIETHÖLTER, P. **Análise da variabilidade genética em genótipos de milho crioulo (*Zea mays ssp. mays*)**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

WIETHÖLTER, P. et al. Genetic variability in corn landraces from southern Brazil. **Maydica**, Bergamo, v. 53, n. 2, p. 151-159, 2008.

WILKES, H. G. **Teosinte: The Closest Relative of Maize**. Cambridge: Bussey Institute of Harvard University. 1967.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WINKLER, L. **Melhoramento genético de plantas por meio de ideotipos**, 2006. 7 p. (Informativo Fundacep 2).

WRIGHT, S. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding, and selection in evolution. **Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress of Genetics**, New York, v. 1, p. 356-366, 1932.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, Baltimore, v. 28, p. 114-138, 1943.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, Lancaster, v. 19, p. 395-420, 1965.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago, 1978. 580 p.

WONG, J. C. et al. QTL associated with accumulation of tocopherols in maize. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 6, p. 2257-2266, 2003.

YAMASAKI, M.; WRIGHT, S. I.; MCMULLEN, M. D. Genomic screening for artificial selection during domestication and improvement in maize. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 967-973, 2007.

YANAKA, F. Y. **Caracterização molecular e isoenzimática de acessos de *Bromus auleticus* TRINIUS (EX-NESS)**. 2002. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ZHANG, F.; WAN, X. Q.; PAN, G. T. QTL mapping of *Fusarium moniliforme* ear rot resistance in maize. 1. Map construction with microsatellite and AFLP markers. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 47, n. 1, p. 9-15, 2006.

ZHANG, J.; PETERSON, T. Genome rearrangements by nonlinear transposons in maize. **Genetics**, Baltimore, v. 153, n. 3, p. 1403-1410, 1999.

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

## 7 APÊNDICE

APÊNDICE 1. Composição do substrato utilizado na germinação do material em sala de crescimento.

- 25 % de casca de *Pinus*
- 25 % de casca de arroz
- 50 % de lodo aeróbico
- pH 5,8
- compostado por 18 meses

Fornecedor:  
Policultura Rosa  
RS 040, Km 23  
Águas Claras – Viamão, RS  
(51) 3250.5543 (51) 9985.8330  
Site: [www.policulturarosa.com.br](http://www.policulturarosa.com.br)

APÊNDICE 2. Solução de extração (pH 8,0) para eletroforese de isoenzimas (Collins *et al.*, 1984) modificada.

- |  |         |
|--|---------|
| - Fosfato de sódio dibásico anidro       | 0,355 g |
| - Ditioneitol (DTT)                      | 0,075 g |
| - Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) | 0,085 g |
| - Tritox-100                             | 1 ml    |
| - Água destilada (até completar)         | 50 ml   |

APÊNDICE 3. Soluções utilizadas nas cubas eletrolíticas e nos géis de poliacrilamida para eletroforese de isoenzimas (Scandalios, 1969).

Solução tampão A (tampão Borato de Lítio 0,24 M, pH 8,3)

- |                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| - Hidróxido de lítio anidro      | 1,20 g  |
| - Ácido bórico anidro            | 11,89 g |
| - Água destilada (até completar) | 1000 ml |

Solução tampão B (tampão tris-citrato 0,0595 M, pH 8,3)

- |  |         |
|--|---------|
| - Tris hidroximetil-aminometano anidro | 6,297 g |
| - Ácido cítrico anidro                 | 1,537 g |
| - Água destilada (até completar)       | 1000 ml |

Solução estoque (Bis-acrilamida)

- |  |        |
|--|--------|
| - acrilamida                                     | 16 g   |
| - Bis-acrilamida                                 | 0,8 g  |
| - TEMED (N, N, N', N' – tetrametiletlenodiamina) | 0,2 ml |
| - Água destilada                                 | 200 ml |

APÊNDICE 4. Solução de coloração para alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) esterases (Scandalios, 1969) modificada.

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| - $\alpha$ -naftil acetato | 0,055 g |
| - $\beta$ -naftil acetato  | 0,045 g |
| - <i>Fast blue BB salt</i> | 0,060 g |

Tampões de coloração C (50 ml) + D (10 ml) + água destilada até completar 100ml

Tampão C (Fosfato de sódio monobásico 0,2 M, pH 4,3)

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| - Fosfato de sódio monobásico anidro | 6.8995 g |
| - Água destilada (até completar)     | 250 ml   |

Tampão D (Fosfato de sódio dibásico 0,2 M, pH 9,2)

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| - Fosfato de sódio dibásico anidro | 2,84 g |
| - Água destilada (até completar)   | 100 ml |

APÊNDICE 5. Solução de fixação de Ayala.

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| - Álcool metílico                | 450 ml |
| - Ácido acético                  | 110 ml |
| - Água destilada (até completar) | 900 ml |

APÊNDICE 6. Análise de variância a partir dos dados fenotípicos das populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) em relação às testemunhas (linhagens de milho: P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), pelo SAS.

|       | Class | Levels    | Values |
|-------|-------|-----------|--------|
| LOCAL | 2     | 1 2       |        |
| POP   | 5     | 1 2 3 5 8 |        |

Number of observations 74

Dependent Variables With Equivalent Missing Value Patterns

|   | Dependent | Pattern     | Obs | Variables |
|---|-----------|-------------|-----|-----------|
| 1 | 54        | EST INSE    |     |           |
| 2 | 70        | CI NI       |     |           |
| 3 | 64        | NFACE NFABE |     |           |
| 4 | 57        | CFIE LFIE   |     |           |

Dependent Variable: EST EST

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 6  | 57098.15856    | 9516.35976  | 54.12   | <.0001 |
| Error           | 47 | 8264.44792     | 175.83932   |         |        |
| Corrected Total | 53 | 65362.60648    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | EST Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.873560 | 5.847567  | 13.26044 | 226.7685 |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 43470.42187 | 43470.42187 | 247.22  | <.0001 |
| POP       | 4  | 21770.29167 | 5442.57292  | 30.95   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 1  | 5376.33333  | 5376.33333  | 30.58   | <.0001 |

Dependent Variable: INSE INSE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 6  | 39213.13079    | 6535.52180  | 59.10   | <.0001 |
| Error           | 47 | 5197.40625     | 110.58311   |         |        |
| Corrected Total | 53 | 44410.53704    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | INSE Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0.882969 | 6.832582  | 10.51585 | 153.9074  |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 150.52083   | 150.52083   | 1.36    | 0.2492 |
| POP       | 4  | 31835.70521 | 7958.92630  | 71.97   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 1  | 2530.25521  | 2530.25521  | 22.88   | <.0001 |

Dependent Variable: CI CI

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 8  | 1023.651948    | 127.956493  | 63.91   | <.0001 |
| Error           | 61 | 122.139740     | 2.002291    |         |        |
| Corrected Total | 69 | 1145.791688    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | CI Mean  |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.893401 | 9.917808  | 1.415023 | 14.26750 |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 94.2933799  | 94.2933799  | 47.09   | <.0001 |
| POP       | 4  | 384.1420180 | 96.0355045  | 47.96   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 3  | 174.3192965 | 58.1064322  | 29.02   | <.0001 |

Dependent Variable: NI NI

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 8  | 937.9078869    | 117.2384859 | 136.40  | <.0001 |
| Error           | 61 | 52.4322917     | 0.8595458   |         |        |
| Corrected Total | 69 | 990.3401786    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | NI Mean  |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.947056 | 8.719944  | 0.927117 | 10.63214 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|

|           |   |             |             |        |        |
|-----------|---|-------------|-------------|--------|--------|
| LOCAL     | 1 | 487.0858004 | 487.0858004 | 566.68 | <.0001 |
| POP       | 4 | 73.4241716  | 18.3560429  | 21.36  | <.0001 |
| LOCAL*POP | 3 | 107.6144052 | 35.8714684  | 41.73  | <.0001 |

Dependent Variable: NFACE NFACE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 8  | 172.8058036    | 21.6007254  | 39.04   | <.0001 |
| Error           | 55 | 30.4285714     | 0.5532468   |         |        |
| Corrected Total | 63 | 203.2343750    |             |         |        |

|          |           |          |            |
|----------|-----------|----------|------------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | NFACE Mean |
| 0.850278 | 20.97073  | 0.743806 | 3.546875   |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 37.28853383 | 37.28853383 | 67.40   | <.0001 |
| POP       | 4  | 77.53271563 | 19.38317891 | 35.04   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 3  | 4.43111733  | 1.47703911  | 2.67    | 0.0564 |

Dependent Variable: NFABE NFABE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 8  | 267.3355655    | 33.4169457  | 28.65   | <.0001 |
| Error           | 55 | 64.1488095     | 1.1663420   |         |        |
| Corrected Total | 63 | 331.4843750    |             |         |        |

|          |           |          |            |
|----------|-----------|----------|------------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | NFABE Mean |
| 0.806480 | 13.21573  | 1.079973 | 8.171875   |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 0.8309054   | 0.8309054   | 0.71    | 0.4023 |
| POP       | 4  | 205.4922173 | 51.3730543  | 44.05   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 3  | 18.9587457  | 6.3195819   | 5.42    | 0.0024 |

Dependent Variable: CFIE CFIE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 7  | 25641.27290    | 3663.03899  | 102.89  | <.0001 |
| Error           | 49 | 1744.40953     | 35.60019    |         |        |
| Corrected Total | 56 | 27385.68243    |             |         |        |

|          |           |          |           |
|----------|-----------|----------|-----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | CFIE Mean |
| 0.936302 | 10.22298  | 5.966590 | 58.36447  |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 7153.031254 | 7153.031254 | 200.93  | <.0001 |
| POP       | 4  | 985.231829  | 246.307957  | 6.92    | 0.0002 |
| LOCAL*POP | 2  | 2012.375630 | 1006.187815 | 28.26   | <.0001 |

Dependent Variable: LFIE LFIE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 7  | 174.8947094    | 24.9849585  | 18.04   | <.0001 |
| Error           | 49 | 67.8678125     | 1.3850574   |         |        |
| Corrected Total | 56 | 242.7625219    |             |         |        |

|          |           |          |           |
|----------|-----------|----------|-----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | LFIE Mean |
| 0.720435 | 20.01266  | 1.176885 | 5.880702  |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 13.3172024  | 13.3172024  | 9.61    | 0.0032 |
| POP       | 4  | 135.3524334 | 33.8381084  | 24.43   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 2  | 5.1034422   | 2.5517211   | 1.84    | 0.1693 |

APÊNDICE 7. Teste Tukey-Kramer de comparação entre médias significativas (ajustadas pelo LSMean), a partir dos dados fenotípicos das populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) em relação às testemunhas (linhagens de milho: P2: 672733, P5: 672736 e P6: 672739), pelo SAS.

|       | Class | Levels    | Values |
|-------|-------|-----------|--------|
| LOCAL | 2     | 1 2       |        |
| POP   | 5     | 1 2 3 5 8 |        |

Number of observations 74

Dependent Variables With Equivalent Missing Value Patterns

| Dependent | Pattern        | Obs | Variables |
|-----------|----------------|-----|-----------|
| 1         | 54 EST INSE    |     |           |
| 2         | 70 CI NI       |     |           |
| 3         | 64 NFACE NFABE |     |           |
| 4         | 57 CFIE LFIE   |     |           |

Dependent Variable: EST EST

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 6  | 57098.15856    | 9516.35976  | 54.12   | <.0001 |
| Error           | 47 | 8264.44792     | 175.83932   |         |        |
| Corrected Total | 53 | 65362.60648    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | EST Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.873560 | 5.847567  | 13.26044 | 226.7685 |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 43470.42187 | 43470.42187 | 247.22  | <.0001 |
| POP       | 4  | 21770.29167 | 5442.57292  | 30.95   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 1  | 5376.33333  | 5376.33333  | 30.58   | <.0001 |

The GLM Procedure  
Least Squares Means  
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

|       |     | LSMEAN     |        |        |
|-------|-----|------------|--------|--------|
| LOCAL | POP | EST        | LSMEAN | Number |
| 1     | 1   | 275.833333 |        | 1      |
| 1     | 2   | 245.416667 |        | 2      |
| 1     | 3   | 177.500000 |        | 3      |
| 1     | 5   | 207.500000 |        | 4      |
| 1     | 8   | 205.000000 |        | 5      |
| 2     | 1   | 194.479167 |        | 6      |
| 2     | 2   | 206.395833 |        | 7      |

Dependent Variable: EST

| ij | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1  |        | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| 2  | <.0001 |        | <.0001 | 0.0083 | 0.0040 | <.0001 | <.0001 |
| 3  | <.0001 | <.0001 |        | 0.2836 | 0.3845 | 0.6345 | 0.0859 |
| 4  | <.0001 | 0.0083 | 0.2836 |        | 1.0000 | 0.8550 | 1.0000 |
| 5  | <.0001 | 0.0040 | 0.3845 | 1.0000 |        | 0.9421 | 1.0000 |
| 6  | <.0001 | <.0001 | 0.6345 | 0.8550 | 0.9421 |        | 0.3144 |
| 7  | <.0001 | <.0001 | 0.0859 | 1.0000 | 1.0000 | 0.3144 |        |

Dependent Variable: INSE INSE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 6  | 39213.13079    | 6535.52180  | 59.10   | <.0001 |
| Error           | 47 | 5197.40625     | 110.58311   |         |        |
| Corrected Total | 53 | 44410.53704    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | INSE Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0.882969 | 6.832582  | 10.51585 | 153.9074  |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 150.52083   | 150.52083   | 1.36    | 0.2492 |
| POP       | 4  | 31835.70521 | 7958.92630  | 71.97   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 1  | 2530.25521  | 2530.25521  | 22.88   | <.0001 |

|       |     | LSMEAN     |        |        |
|-------|-----|------------|--------|--------|
| LOCAL | POP | INSE       | LSMEAN | Number |
| 1     | 1   | 174.000000 |        | 1      |
| 1     | 2   | 147.916667 |        | 2      |
| 1     | 3   | 62.500000  |        | 3      |
| 1     | 5   | 95.000000  |        | 4      |
| 1     | 8   | 92.500000  |        | 5      |
| 2     | 1   | 163.020833 |        | 6      |
| 2     | 2   | 165.979167 |        | 7      |

Dependent Variable: INSE

| ij | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1  |        | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.1629 | 0.5107 |
| 2  | <.0001 |        | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.0158 | 0.0021 |
| 3  | <.0001 | <.0001 |        | 0.0486 | 0.0859 | <.0001 | <.0001 |
| 4  | <.0001 | <.0001 | 0.0486 |        | 1.0000 | <.0001 | <.0001 |
| 5  | <.0001 | <.0001 | 0.0859 | 1.0000 |        | <.0001 | <.0001 |
| 6  | 0.1629 | 0.0158 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        | 0.9926 |
| 7  | 0.5107 | 0.0021 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.9926 |        |

Dependent Variable: CI CI

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 8  | 1023.651948    | 127.956493  | 63.91   | <.0001 |
| Error           | 61 | 122.139740     | 2.002291    |         |        |
| Corrected Total | 69 | 1145.791688    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | CI Mean  |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.893401 | 9.917808  | 1.415023 | 14.26750 |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 94.2933799  | 94.2933799  | 47.09   | <.0001 |
| POP       | 4  | 384.1420180 | 96.0355045  | 47.96   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 3  | 174.3192965 | 58.1064322  | 29.02   | <.0001 |

The GLM Procedure  
Least Squares Means  
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

| LOCAL | POP | LSMEAN<br>CI LSMEAN | Number |
|-------|-----|---------------------|--------|
| 1     | 1   | 13.9166667          | 1      |
| 1     | 2   | 19.0000000          | 2      |
| 1     | 3   | 14.5000000          | 3      |
| 1     | 5   | 13.7500000          | 4      |
| 1     | 8   | 14.2500000          | 5      |
| 2     | 1   | 16.1604167          | 6      |
| 2     | 2   | 16.1250000          | 7      |
| 2     | 5   | 10.4500000          | 8      |
| 2     | 8   | 5.9625000           | 9      |

Dependent Variable: CI

| ij | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1  |        | <.0001 | 0.9998 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0074 | 0.0089 | <.0001 | <.0001 |
| 2  | <.0001 |        | 0.0030 | 0.0003 | 0.0014 | 0.0002 | 0.0002 | <.0001 | <.0001 |
| 3  | 0.9998 | 0.0030 |        | 0.9998 | 1.0000 | 0.8338 | 0.8495 | 0.0163 | <.0001 |
| 4  | 1.0000 | 0.0003 | 0.9998 |        | 1.0000 | 0.4000 | 0.4203 | 0.0969 | <.0001 |
| 5  | 1.0000 | 0.0014 | 1.0000 | 1.0000 |        | 0.7025 | 0.7229 | 0.0307 | <.0001 |
| 6  | 0.0074 | 0.0002 | 0.8338 | 0.4000 | 0.7025 |        | 1.0000 | <.0001 | <.0001 |
| 7  | 0.0089 | 0.0002 | 0.8495 | 0.4203 | 0.7229 | 1.0000 |        | <.0001 | <.0001 |
| 8  | <.0001 | <.0001 | 0.0163 | 0.0969 | 0.0307 | <.0001 | <.0001 |        | <.0001 |
| 9  | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        |

Dependent Variable: NI NI

| Source          | DF | Sum of<br>Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|-------------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 8  | 937.9078869       | 117.2384859 | 136.40  | <.0001 |
| Error           | 61 | 52.4322917        | 0.8595458   |         |        |
| Corrected Total | 69 | 990.3401786       |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | NI Mean  |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.947056 | 8.719944  | 0.927117 | 10.63214 |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 487.0858004 | 487.0858004 | 566.68  | <.0001 |
| POP       | 4  | 73.4241716  | 18.3560429  | 21.36   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 3  | 107.6144052 | 35.8714684  | 41.73   | <.0001 |

| LOCAL | POP | NI LSMEAN  | Number |
|-------|-----|------------|--------|
| 1     | 1   | 15.3333333 | 1      |
| 1     | 2   | 12.5000000 | 2      |
| 1     | 3   | 15.0000000 | 3      |
| 1     | 5   | 15.0000000 | 4      |
| 1     | 8   | 15.0000000 | 5      |
| 2     | 1   | 10.2500000 | 6      |
| 2     | 2   | 9.6875000  | 7      |
| 2     | 5   | 5.7500000  | 8      |
| 2     | 8   | 4.3750000  | 9      |

Dependent Variable: NI

| i/j | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   |        | <.0001 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| 2   | <.0001 |        | 0.0211 | 0.0211 | 0.0211 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| 3   | 0.9999 | 0.0211 |        | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| 4   | 0.9999 | 0.0211 | 1.0000 |        | 1.0000 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| 5   | 0.9999 | 0.0211 | 1.0000 | 1.0000 |        | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| 6   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        | 0.8576 | <.0001 | <.0001 |
| 7   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.8576 |        | <.0001 | <.0001 |
| 8   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        | 0.0933 |
| 9   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.0933 |        |

Dependent Variable: NFACE NFACE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 8  | 172.8058036    | 21.6007254  | 39.04   | <.0001 |
| Error           | 55 | 30.4285714     | 0.5532468   |         |        |
| Corrected Total | 63 | 203.2343750    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | NFACE Mean |
|----------|-----------|----------|------------|
| 0.850278 | 20.97073  | 0.743806 | 3.546875   |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 37.28853383 | 37.28853383 | 67.40   | <.0001 |
| POP       | 4  | 77.53271563 | 19.38317891 | 35.04   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 3  | 4.43111733  | 1.47703911  | 2.67    | 0.0564 |

The GLM Procedure  
Least Squares Means  
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

|       |     | LSMEAN     |        |        |
|-------|-----|------------|--------|--------|
| LOCAL | POP | NFACE      | LSMEAN | Number |
| 1     | 1   | 4.33333333 | 4      | 1      |
| 1     | 2   | 4.33333333 | 4      | 2      |
| 1     | 3   | 7.00000000 | 7      | 3      |
| 1     | 5   | 6.00000000 | 6      | 4      |
| 1     | 8   | 5.50000000 | 5      | 5      |
| 2     | 1   | 1.54166667 | 1      | 6      |
| 2     | 2   | 1.62500000 | 1      | 7      |
| 2     | 3   | 6.00000000 | 6      | 8      |
| 2     | 5   | 4.28571429 | 4      | 9      |

Dependent Variable: NFACE

| i/j | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   |        | 1.0000 | 0.0006 | 0.1028 | 0.5143 | <.0001 | <.0001 | 0.0261 | 1.0000 |
| 2   | 1.0000 |        | 0.0006 | 0.1028 | 0.5143 | <.0001 | <.0001 | 0.0261 | 1.0000 |
| 3   | 0.0006 | 0.0006 |        | 0.9130 | 0.5389 | <.0001 | <.0001 | 0.8631 | 0.0009 |
| 4   | 0.1028 | 0.1028 | 0.9130 |        | 0.9990 | <.0001 | <.0001 | 1.0000 | 0.1177 |
| 5   | 0.5143 | 0.5143 | 0.5389 | 0.9990 |        | <.0001 | <.0001 | 0.9980 | 0.5260 |
| 6   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        | 1.0000 | <.0001 | <.0001 |
| 7   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 1.0000 |        | <.0001 | <.0001 |
| 8   | 0.0261 | 0.0261 | 0.8631 | 1.0000 | 0.9980 | <.0001 | <.0001 |        | 0.0373 |
| 9   | 1.0000 | 1.0000 | 0.0009 | 0.1177 | 0.5260 | <.0001 | <.0001 | 0.0373 |        |

Dependent Variable: NFABE NFABE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 8  | 267.3355655    | 33.4169457  | 28.65   | <.0001 |
| Error           | 55 | 64.1488095     | 1.1663420   |         |        |
| Corrected Total | 63 | 331.4843750    |             |         |        |

R-Square Coeff Var Root MSE NFABE Mean  
0.806480 13.21573 1.079973 8.171875

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 0.8309054   | 0.8309054   | 0.71    | 0.4023 |
| POP       | 4  | 205.4922173 | 51.3730543  | 44.05   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 3  | 18.9587457  | 6.3195819   | 5.42    | 0.0024 |

The GLM Procedure  
Least Squares Means  
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

|       |     | LSMEAN     |        |        |
|-------|-----|------------|--------|--------|
| LOCAL | POP | NFABE      | LSMEAN | Number |
| 1     | 1   | 8.8333333  |        | 1      |
| 1     | 2   | 8.9166667  |        | 2      |
| 1     | 3   | 5.5000000  |        | 3      |
| 1     | 5   | 5.5000000  |        | 4      |
| 1     | 8   | 6.0000000  |        | 5      |
| 2     | 1   | 8.8333333  |        | 6      |
| 2     | 2   | 10.5000000 |        | 7      |
| 2     | 3   | 3.3333333  |        | 8      |
| 2     | 5   | 4.8571429  |        | 9      |

Dependent Variable: NFABE

| i/j | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   |        | 1.0000 | 0.0049 | 0.0049 | 0.0289 | 1.0000 | 0.0108 | <.0001 | <.0001 |
| 2   | 1.0000 |        | 0.0036 | 0.0036 | 0.0218 | 1.0000 | 0.0187 | <.0001 | <.0001 |
| 3   | 0.0049 | 0.0036 |        | 1.0000 | 0.9999 | 0.0049 | <.0001 | 0.4215 | 0.9979 |
| 4   | 0.0049 | 0.0036 | 1.0000 |        | 0.9999 | 0.0049 | <.0001 | 0.4215 | 0.9979 |
| 5   | 0.0289 | 0.0218 | 0.9999 | 0.9999 |        | 0.0289 | <.0001 | 0.1701 | 0.9210 |
| 6   | 1.0000 | 1.0000 | 0.0049 | 0.0049 | 0.0289 |        | 0.0108 | <.0001 | <.0001 |
| 7   | 0.0108 | 0.0187 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.0108 |        | <.0001 | <.0001 |
| 8   | <.0001 | <.0001 | 0.4215 | 0.4215 | 0.1701 | <.0001 | <.0001 |        | 0.5203 |
| 9   | <.0001 | <.0001 | 0.9979 | 0.9979 | 0.9210 | <.0001 | <.0001 | 0.5203 |        |

Dependent Variable: CFIE CFIE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 7  | 25641.27290    | 3663.03899  | 102.89  | <.0001 |
| Error           | 49 | 1744.40953     | 35.60019    |         |        |
| Corrected Total | 56 | 27385.68243    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | CFIE Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0.936302 | 10.22298  | 5.966590 | 58.36447  |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 7153.031254 | 7153.031254 | 200.93  | <.0001 |
| POP       | 4  | 985.231829  | 246.307957  | 6.92    | 0.0002 |
| LOCAL*POP | 2  | 2012.375630 | 1006.187815 | 28.26   | <.0001 |

The GLM Procedure  
Least Squares Means  
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

|       |     | LSMEAN     |        |        |
|-------|-----|------------|--------|--------|
| LOCAL | POP | CFIE       | LSMEAN | Number |
| 1     | 1   | 79.6666667 |        | 1      |
| 1     | 2   | 76.7500000 |        | 2      |
| 1     | 3   | 70.0000000 |        | 3      |
| 1     | 5   | 72.0000000 |        | 4      |
| 1     | 8   | 74.0000000 |        | 5      |
| 2     | 1   | 32.7104167 |        | 6      |
| 2     | 2   | 34.6875000 |        | 7      |
| 2     | 5   | 69.6666667 |        | 8      |

Dependent Variable: CFIE

| i/j | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   |        | 0.9289 | 0.4163 | 0.6982 | 0.9145 | <.0001 | <.0001 | 0.1820 |
| 2   | 0.9289 |        | 0.8135 | 0.9653 | 0.9987 | <.0001 | <.0001 | 0.5975 |
| 3   | 0.4163 | 0.8135 |        | 1.0000 | 0.9974 | <.0001 | <.0001 | 1.0000 |
| 4   | 0.6982 | 0.9653 | 1.0000 |        | 1.0000 | <.0001 | <.0001 | 0.9999 |
| 5   | 0.9145 | 0.9987 | 0.9974 | 1.0000 |        | <.0001 | <.0001 | 0.9926 |
| 6   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        | 0.9917 | <.0001 |
| 7   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.9917 |        | <.0001 |
| 8   | 0.1820 | 0.5975 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9926 | <.0001 | <.0001 |        |

Dependent Variable: LFIE LFIE

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 7  | 174.8947094    | 24.9849585  | 18.04   | <.0001 |
| Error           | 49 | 67.8678125     | 1.3850574   |         |        |
| Corrected Total | 56 | 242.7625219    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | LFIE Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0.720435 | 20.01266  | 1.176885 | 5.880702  |

| Source    | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| LOCAL     | 1  | 13.3172024  | 13.3172024  | 9.61    | 0.0032 |
| POP       | 4  | 135.3524334 | 33.8381084  | 24.43   | <.0001 |
| LOCAL*POP | 2  | 5.1034422   | 2.5517211   | 1.84    | 0.1693 |

The GLM Procedure  
Least Squares Means  
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey-Kramer

|  | LOCAL | POP | LSMEAN<br>LFIE LSMEAN | Number |
|--|-------|-----|-----------------------|--------|
|  | 1     | 1   | 5.3750000             | 1      |
|  | 1     | 2   | 6.5000000             | 2      |
|  | 1     | 3   | 7.5000000             | 3      |
|  | 1     | 5   | 10.7500000            | 4      |
|  | 1     | 8   | 9.5000000             | 5      |
|  | 2     | 1   | 4.5895833             | 6      |
|  | 2     | 2   | 4.4270833             | 7      |
|  | 2     | 5   | 9.6666667             | 8      |

Dependent Variable: LFIE

| ij | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1  |        | 0.2930 | 0.2817 | <.0001 | 0.0008 | 0.7274 | 0.5099 | <.0001 |
| 2  | 0.2930 |        | 0.9510 | 0.0005 | 0.0321 | 0.0052 | 0.0018 | 0.0029 |
| 3  | 0.2817 | 0.9510 |        | 0.1290 | 0.6875 | 0.0416 | 0.0258 | 0.4816 |
| 4  | <.0001 | 0.0005 | 0.1290 |        | 0.9616 | <.0001 | <.0001 | 0.9710 |
| 5  | 0.0008 | 0.0321 | 0.6875 | 0.9616 |        | <.0001 | <.0001 | 1.0000 |
| 6  | 0.7274 | 0.0052 | 0.0416 | <.0001 | <.0001 |        | 1.0000 | <.0001 |
| 7  | 0.5099 | 0.0018 | 0.0258 | <.0001 | <.0001 | 1.0000 |        | <.0001 |
| 8  | <.0001 | 0.0029 | 0.4816 | 0.9710 | 1.0000 | <.0001 | <.0001 |        |

APÊNDICE 8. Estatística descritiva dos dados de microssatélites das populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) pelo TFPGA.

Data set contains genotypes of individuals sampled from populations.

Organism Type: Diploid

Marker Type: Codominant

DESCRIPTIVE STATISTICS

RESULTS FOR EACH POPULATION.

POPULATION 1

Locus 1 # obs. at locus= 21

| allele: | # obs: | allele freq: | # hets: | het freq: |
|---------|--------|--------------|---------|-----------|
| 1       | 27     | 0,6429       | 11,0000 | 0,5238    |
| 2       | 10     | 0,2381       | 8,0000  | 0,3810    |
| 3       | 4      | 0,0952       | 4,0000  | 0,1905    |
| 4       | 1      | 0,0238       | 1,0000  | 0,0476    |

Heterozygosity: 0,5204

Heterozygosity (unbiased): 0,5331

Heterozygosity (direct count): 0,5714

Locus 2 # obs. at locus= 6  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 12 1,0000 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,0000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0000  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 3 # obs. at locus= 19  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 26 0,6842 0,0000 0,0000  
 2 8 0,2105 0,0000 0,0000  
 3 4 0,1053 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,4765  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4893  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 4 # obs. at locus= 20  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 6 0,1500 6,0000 0,3000  
 2 34 0,8500 6,0000 0,3000  
 Heterozygosity: 0,2550  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2615  
 Heterozygosity (direct count): 0,3000

Locus 5 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 4 0,0952 0,0000 0,0000  
 2 38 0,9048 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,1723  
 Heterozygosity (unbiased): 0,1765  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 6 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 5 0,1190 3,0000 0,1429  
 2 37 0,8810 3,0000 0,1429  
 Heterozygosity: 0,2098  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2149  
 Heterozygosity (direct count): 0,1429

Locus 7 # obs. at locus= 16  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 4 0,1250 4,0000 0,2500  
 2 16 0,5000 0,0000 0,0000  
 3 12 0,3750 4,0000 0,2500  
 Heterozygosity: 0,5938  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6129  
 Heterozygosity (direct count): 0,2500

Locus 8 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 5 0,1190 5,0000 0,2381  
 2 21 0,5000 3,0000 0,1429  
 3 9 0,2143 5,0000 0,2381  
 4 7 0,1667 3,0000 0,1429  
 Heterozygosity: 0,6621  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6783  
 Heterozygosity (direct count): 0,3810

Locus 9 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 36 0,8571 0,0000 0,0000  
 2 6 0,1429 0,0000 0,0000

Heterozygosity: 0,2449  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2509  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 10 # obs. at locus= 15  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 0 0,0000 0,0000 0,0000  
 2 24 0,8000 0,0000 0,0000  
 3 6 0,2000 0,0000 0,0000

Heterozygosity: 0,3200  
 Heterozygosity (unbiased): 0,3310  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 11 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 6 0,1429 4,0000 0,1905  
 2 36 0,8571 4,0000 0,1905

Heterozygosity: 0,2449  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2509  
 Heterozygosity (direct count): 0,1905

Locus 12 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 12 0,2857 6,0000 0,2857  
 2 30 0,7143 6,0000 0,2857

Heterozygosity: 0,4082  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4181  
 Heterozygosity (direct count): 0,2857

Locus 13 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 42 1,0000 0,0000 0,0000

Heterozygosity: 0,0000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0000  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 14 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 24 0,5714 6,0000 0,2857  
 2 18 0,4286 6,0000 0,2857

Heterozygosity: 0,4898  
 Heterozygosity (unbiased): 0,5017  
 Heterozygosity (direct count): 0,2857

Locus 15 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 42 1,0000 0,0000 0,0000

Heterozygosity: 0,0000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0000  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 16 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 21 0,5000 1,0000 0,0476  
 2 21 0,5000 1,0000 0,0476

Heterozygosity: 0,5000

Heterozygosity (unbiased): 0,5122  
 Heterozygosity (direct count): 0,0476

Locus 17 # obs. at locus= 13

| allele: | # obs: | allele freq: | # hets: | het freq: |
|---------|--------|--------------|---------|-----------|
| 1       | 4      | 0,1538       | 2,0000  | 0,1538    |
| 2       | 10     | 0,3846       | 2,0000  | 0,1538    |
| 3       | 12     | 0,4615       | 0,0000  | 0,0000    |

Heterozygosity: 0,6154  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6400  
 Heterozygosity (direct count): 0,1538

Locus 18 # obs. at locus= 21

| allele: | # obs: | allele freq: | # hets: | het freq: |
|---------|--------|--------------|---------|-----------|
| 1       | 2      | 0,0476       | 2,0000  | 0,0952    |
| 2       | 29     | 0,6905       | 5,0000  | 0,2381    |
| 3       | 11     | 0,2619       | 3,0000  | 0,1429    |

Heterozygosity: 0,4524  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4634  
 Heterozygosity (direct count): 0,2381

Locus 19 # obs. at locus= 21

| allele: | # obs: | allele freq: | # hets: | het freq: |
|---------|--------|--------------|---------|-----------|
| 1       | 5      | 0,1190       | 1,0000  | 0,0476    |
| 2       | 37     | 0,8810       | 1,0000  | 0,0476    |

Heterozygosity: 0,2098  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2149  
 Heterozygosity (direct count): 0,0476

Locus 20 # obs. at locus= 21

| allele: | # obs: | allele freq: | # hets: | het freq: |
|---------|--------|--------------|---------|-----------|
| 1       | 0      | 0,0000       | 0,0000  | 0,0000    |
| 2       | 42     | 1,0000       | 0,0000  | 0,0000    |
| 3       | 0      | 0,0000       | 0,0000  | 0,0000    |

Heterozygosity: 0,0000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0000  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 21 # obs. at locus= 10

| allele: | # obs: | allele freq: | # hets: | het freq: |
|---------|--------|--------------|---------|-----------|
| 1       | 3      | 0,1500       | 3,0000  | 0,3000    |
| 2       | 4      | 0,2000       | 0,0000  | 0,0000    |
| 3       | 13     | 0,6500       | 3,0000  | 0,3000    |

Heterozygosity: 0,5150  
 Heterozygosity (unbiased): 0,5421  
 Heterozygosity (direct count): 0,3000

Locus 22 # obs. at locus= 21

| allele: | # obs: | allele freq: | # hets: | het freq: |
|---------|--------|--------------|---------|-----------|
| 1       | 5      | 0,1190       | 5,0000  | 0,2381    |
| 2       | 13     | 0,3095       | 5,0000  | 0,2381    |
| 3       | 19     | 0,4524       | 5,0000  | 0,2381    |
| 4       | 5      | 0,1190       | 1,0000  | 0,0476    |

Heterozygosity: 0,6712  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6876  
 Heterozygosity (direct count): 0,3810

Locus 23 # obs. at locus= 21  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 2 0,0476 2,0000 0,0952  
 2 16 0,3810 10,0000 0,4762  
 3 8 0,1905 2,0000 0,0952  
 4 16 0,3810 10,0000 0,4762  
 Heterozygosity: 0,6712  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6876  
 Heterozygosity (direct count): 0,5714

Locus 24 # obs. at locus= 19  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 2 0,0526 0,0000 0,0000  
 2 4 0,1053 2,0000 0,1053  
 3 32 0,8421 2,0000 0,1053  
 Heterozygosity: 0,2770  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2845  
 Heterozygosity (direct count): 0,1053

Locus 25 # obs. at locus= 16  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 10 0,3125 0,0000 0,0000  
 2 22 0,6875 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,4297  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4435  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

-----  
 Results over all loci

Ave. sample size: 18,8000  
 Ave. heterozygosity: 0,3576  
 Ave. heterozygosity (unbiased): 0,3678  
 Ave. heterozygosity (direct count): 0,1701  
 % polymorphic loci (no criterion): 84,0000  
 % polymorphic loci (99% criterion): 84,0000  
 % polymorphic loci (95% criterion): 84,0000  
 -----

POPULATION 2

Locus 1 # obs. at locus= 19  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 8 0,2105 8,0000 0,4211  
 2 2 0,0526 2,0000 0,1053  
 3 22 0,5789 6,0000 0,3158  
 4 6 0,1579 4,0000 0,2105  
 Heterozygosity: 0,5928  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6088  
 Heterozygosity (direct count): 0,5263

Locus 2 # obs. at locus= 1  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 2 1,0000 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,0000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0000  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 3 # obs. at locus= 18  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 17 0,4722 7,0000 0,3889  
 2 15 0,4167 7,0000 0,3889  
 3 4 0,1111 4,0000 0,2222  
 Heterozygosity: 0,5910  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6079  
 Heterozygosity (direct count): 0,5000

Locus 4 # obs. at locus= 19  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 18 0,4737 10,0000 0,5263  
 2 20 0,5263 10,0000 0,5263  
 Heterozygosity: 0,4986  
 Heterozygosity (unbiased): 0,5121  
 Heterozygosity (direct count): 0,5263

Locus 5 # obs. at locus= 19  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 1 0,0263 1,0000 0,0526  
 2 37 0,9737 1,0000 0,0526  
 Heterozygosity: 0,0512  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0526  
 Heterozygosity (direct count): 0,0526

Locus 6 # obs. at locus= 19  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 19 0,5000 9,0000 0,4737  
 2 19 0,5000 9,0000 0,4737  
 Heterozygosity: 0,5000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,5135  
 Heterozygosity (direct count): 0,4737

Locus 7 # obs. at locus= 20  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 14 0,3500 6,0000 0,3000  
 2 15 0,3750 5,0000 0,2500  
 3 11 0,2750 11,0000 0,5500  
 Heterozygosity: 0,6612  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6782  
 Heterozygosity (direct count): 0,5500

Locus 8 # obs. at locus= 16  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 11 0,3438 11,0000 0,6875  
 2 8 0,2500 2,0000 0,1250  
 3 9 0,2813 9,0000 0,5625  
 4 4 0,1250 4,0000 0,2500  
 Heterozygosity: 0,7246  
 Heterozygosity (unbiased): 0,7480  
 Heterozygosity (direct count): 0,8125

Locus 9 # obs. at locus= 16  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 32 1,0000 0,0000 0,0000  
 2 0 0,0000 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,0000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0000  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 10 # obs. at locus= 16  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 4 0,1250 4,0000 0,2500  
 2 10 0,3125 0,0000 0,0000  
 3 18 0,5625 4,0000 0,2500  
 Heterozygosity: 0,5703  
 Heterozygosity (unbiased): 0,5887  
 Heterozygosity (direct count): 0,2500

Locus 11 # obs. at locus= 18  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 5 0,1389 3,0000 0,1667  
 2 31 0,8611 3,0000 0,1667  
 Heterozygosity: 0,2392  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2460  
 Heterozygosity (direct count): 0,1667

Locus 12 # obs. at locus= 18  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 12 0,3333 6,0000 0,3333  
 2 24 0,6667 6,0000 0,3333  
 Heterozygosity: 0,4444  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4571  
 Heterozygosity (direct count): 0,3333

Locus 13 # obs. at locus= 18  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 36 1,0000 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,0000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0000  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 14 # obs. at locus= 19  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 12 0,3158 8,0000 0,4211  
 2 26 0,6842 8,0000 0,4211  
 Heterozygosity: 0,4321  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4438  
 Heterozygosity (direct count): 0,4211

Locus 15 # obs. at locus= 20  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 40 1,0000 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,0000  
 Heterozygosity (unbiased): 0,0000  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 16 # obs. at locus= 18  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 6 0,1667 0,0000 0,0000  
 2 30 0,8333 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,2778  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2857  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 17 # obs. at locus= 15  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 10 0,3333 0,0000 0,0000  
 2 20 0,6667 0,0000 0,0000  
 3 0 0,0000 0,0000 0,0000

Heterozygosity: 0,4444  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4598  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 18 # obs. at locus= 19  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 0 0,0000 0,0000 0,0000  
 2 2 0,0526 0,0000 0,0000  
 3 36 0,9474 0,0000 0,0000

Heterozygosity: 0,0997  
 Heterozygosity (unbiased): 0,1024  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 19 # obs. at locus= 18  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 4 0,1111 0,0000 0,0000  
 2 32 0,8889 0,0000 0,0000

Heterozygosity: 0,1975  
 Heterozygosity (unbiased): 0,2032  
 Heterozygosity (direct count): 0,0000

Locus 20 # obs. at locus= 20  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 6 0,1500 6,0000 0,3000  
 2 24 0,6000 0,0000 0,0000  
 3 10 0,2500 6,0000 0,3000

Heterozygosity: 0,5550  
 Heterozygosity (unbiased): 0,5692  
 Heterozygosity (direct count): 0,3000

Locus 21 # obs. at locus= 17  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 8 0,2353 8,0000 0,4706  
 2 16 0,4706 0,0000 0,0000  
 3 10 0,2941 8,0000 0,4706

Heterozygosity: 0,6367  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6560  
 Heterozygosity (direct count): 0,4706

Locus 22 # obs. at locus= 20  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 6 0,1500 6,0000 0,3000  
 2 21 0,5250 9,0000 0,4500  
 3 10 0,2500 4,0000 0,2000  
 4 3 0,0750 3,0000 0,1500

Heterozygosity: 0,6338  
 Heterozygosity (unbiased): 0,6500  
 Heterozygosity (direct count): 0,5500

Locus 23 # obs. at locus= 20  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 0 0,0000 0,0000 0,0000  
 2 28 0,7000 8,0000 0,4000  
 3 5 0,1250 3,0000 0,1500  
 4 7 0,1750 5,0000 0,2500

Heterozygosity: 0,4638  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4756  
 Heterozygosity (direct count): 0,4000

Locus 24 # obs. at locus= 14  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 3 0,1071 1,0000 0,0714  
 2 5 0,1786 1,0000 0,0714  
 3 20 0,7143 0,0000 0,0000  
 Heterozygosity: 0,4464  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4630  
 Heterozygosity (direct count): 0,0714

Locus 25 # obs. at locus= 12  
 allele: # obs: allele freq: # hets: het freq:  
 1 15 0,6250 1,0000 0,0833  
 2 9 0,3750 1,0000 0,0833  
 Heterozygosity: 0,4688  
 Heterozygosity (unbiased): 0,4891  
 Heterozygosity (direct count): 0,0833

---

Results over all loci

Ave. sample size: 17,1600  
 Ave. heterozygosity: 0,3812  
 Ave. heterozygosity (unbiased): 0,3924  
 Ave. heterozygosity (direct count): 0,2595  
 % polymorphic loci (no criterion): 84,0000  
 % polymorphic loci (99% criterion): 84,0000  
 % polymorphic loci (95% criterion): 80,0000

---

APÊNDICE 9. Estatística F dos dados de microssatélites das populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) pelo TFPGA.

Data set contains genotypes of individuals sampled from populations.  
 Organism Type: Diploid  
 Marker Type: Codominant

F-STATISTICS

| LOCUS 1      | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,1892 | 0,3045  | -,1657 |
| 2            | 0,0816 | 0,1045  | -,0255 |
| 3            | 0,5504 | 0,4021  | 0,2480 |
| 4            | 0,2590 | 0,0790  | 0,1954 |
| over alleles | 0,3050 | 0,2804  | 0,0343 |

| LOCUS 2      | F         | theta P   | f         |
|--------------|-----------|-----------|-----------|
| allele       |           |           |           |
| 1            | undefined | undefined | undefined |
| over alleles | undefined | undefined | undefined |

| LOCUS 3      | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,6285 | 0,0467  | 0,6103 |
| 2            | 0,5793 | 0,0547  | 0,5549 |
| 3            | 0,4394 | -,0410  | 0,4615 |
| over alleles | 0,5776 | 0,0352  | 0,5622 |

| LOCUS 4      | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,1425 | 0,1999  | -,0717 |
| 2            | 0,1425 | 0,1999  | -,0717 |
| over alleles | 0,1425 | 0,1999  | -,0717 |

| LOCUS 5      | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,7909 | -,0054  | 0,7920 |
| 2            | 0,7909 | -,0054  | 0,7920 |
| over alleles | 0,7909 | -,0054  | 0,7920 |

| LOCUS 6      | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,3911 | 0,2734  | 0,1621 |
| 2            | 0,3911 | 0,2734  | 0,1621 |
| over alleles | 0,3911 | 0,2734  | 0,1621 |

| LOCUS 7      | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,3064 | 0,0950  | 0,2335 |
| 2            | 0,7211 | -,0180  | 0,7260 |
| 3            | 0,0524 | -,0073  | 0,0592 |
| over alleles | 0,3772 | 0,0193  | 0,3650 |

| LOCUS 8      | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | -,1863 | 0,1229  | -,3524 |
| 2            | 0,7340 | 0,0797  | 0,7110 |
| 3            | -,0220 | -,0157  | -,0062 |
| 4            | 0,2546 | -,0293  | 0,2759 |
| over alleles | 0,2415 | 0,0481  | 0,2032 |

| LOCUS 9      | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 1,0000 | 0,0773  | 1,0000 |
| 2            | 1,0000 | 0,0773  | 1,0000 |
| over alleles | 1,0000 | 0,0773  | 1,0000 |

| LOCUS 10     | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | -,0039 | 0,0956  | -,1100 |
| 2            | 1,0000 | 0,3446  | 1,0000 |
| 3            | 0,7612 | 0,1992  | 0,7017 |
| over alleles | 0,7989 | 0,2584  | 0,7288 |

| LOCUS 11     | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,2590 | -,0342  | 0,2835 |
| 2            | 0,2590 | -,0342  | 0,2835 |
| over alleles | 0,2590 | -,0342  | 0,2835 |

| LOCUS 12     | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,2796 | -,0292  | 0,3000 |
| 2            | 0,2796 | -,0292  | 0,3000 |
| over alleles | 0,2796 | -,0292  | 0,3000 |

LOCUS 13 F theta P f  
 allele  
 1 undefined undefined undefined  
 over alleles undefined undefined undefined

LOCUS 14 F theta P f  
 allele  
 1 0,3368 0,0951 0,2671  
 2 0,3368 0,0951 0,2671  
 over alleles 0,3368 0,0951 0,2671

LOCUS 15 F theta P f  
 allele  
 1 undefined undefined undefined  
 over alleles undefined undefined undefined

LOCUS 16 F theta P f  
 allele  
 1 0,9496 0,1774 0,9387  
 2 0,9496 0,1774 0,9387  
 over alleles 0,9496 0,1774 0,9387

LOCUS 17 F theta P f  
 allele  
 1 0,8173 0,0185 0,8139  
 2 0,8671 0,0873 0,8543  
 3 1,0000 0,4399 1,0000  
 over alleles 0,8959 0,1817 0,8728

LOCUS 18 F theta P f  
 allele  
 1 -,0023 0,0215 -,0244  
 2 0,8158 0,5833 0,5580  
 3 0,8959 0,6368 0,7132  
 over alleles 0,8274 0,5906 0,5785

LOCUS 19 F theta P f  
 allele  
 1 0,8744 -,0507 0,8804  
 2 0,8744 -,0507 0,8804  
 over alleles 0,8744 -,0507 0,8804

LOCUS 20 F theta P f  
 allele  
 1 0,0037 0,1353 -,1521  
 2 1,0000 0,3755 1,0000  
 3 0,4037 0,2317 0,2239  
 over alleles 0,6278 0,2857 0,4790

LOCUS 21 F theta P f  
 allele  
 1 -,2435 -,0085 -,2330  
 2 1,0000 0,0719 1,0000  
 3 0,2663 0,1931 0,0907  
 over alleles 0,4121 0,1015 0,3457

| LOCUS 22     | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | -,1526 | -,0174  | -,1328 |
| 2            | 0,3287 | 0,0619  | 0,2844 |
| 3            | 0,5404 | 0,0506  | 0,5159 |
| 4            | 0,4490 | -,0257  | 0,4628 |
| over alleles | 0,3361 | 0,0337  | 0,3130 |

| LOCUS 23     | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | -,0011 | 0,0233  | -,0250 |
| 2            | 0,1992 | 0,1644  | 0,0416 |
| 3            | 0,5466 | -,0229  | 0,5567 |
| 4            | 0,1389 | 0,0757  | 0,0683 |
| over alleles | 0,2442 | 0,0909  | 0,1686 |

| LOCUS 24     | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,7856 | -,0366  | 0,7932 |
| 2            | 0,6180 | -,0294  | 0,6290 |
| 3            | 0,8229 | -,0094  | 0,8245 |
| over alleles | 0,7480 | -,0213  | 0,7533 |

| LOCUS 25     | F      | theta P | f      |
|--------------|--------|---------|--------|
| allele       |        |         |        |
| 1            | 0,9343 | 0,1178  | 0,9255 |
| 2            | 0,9343 | 0,1178  | 0,9255 |
| over alleles | 0,9343 | 0,1178  | 0,9255 |

## OVER ALL LOCI

| F      | theta  | f      |
|--------|--------|--------|
| 0,5271 | 0,1484 | 0,4446 |

## JACKKNIFING OVER LOCI

Replicates from sequential elimination of loci.

| replicate | F      | theta P | f      |
|-----------|--------|---------|--------|
| 1         | 0,5437 | 0,1385  | 0,4704 |
| 2         | 0,5271 | 0,1484  | 0,4446 |
| 3         | 0,5244 | 0,1545  | 0,4374 |
| 4         | 0,5440 | 0,1462  | 0,4660 |
| 5         | 0,5243 | 0,1501  | 0,4403 |
| 6         | 0,5332 | 0,1428  | 0,4555 |
| 7         | 0,5365 | 0,1565  | 0,4504 |
| 8         | 0,5473 | 0,1555  | 0,4639 |
| 9         | 0,5203 | 0,1494  | 0,4360 |
| 10        | 0,5108 | 0,1418  | 0,4299 |
| 11        | 0,5329 | 0,1524  | 0,4489 |
| 12        | 0,5368 | 0,1554  | 0,4515 |
| 13        | 0,5271 | 0,1484  | 0,4446 |
| 14        | 0,5364 | 0,1510  | 0,4539 |
| 15        | 0,5271 | 0,1484  | 0,4446 |
| 16        | 0,5072 | 0,1471  | 0,4222 |
| 17        | 0,5033 | 0,1463  | 0,4182 |
| 18        | 0,5066 | 0,1182  | 0,4404 |
| 19        | 0,5207 | 0,1521  | 0,4347 |

|         |        |        |        |
|---------|--------|--------|--------|
| 20      | 0,5234 | 0,1435 | 0,4436 |
| 21      | 0,5346 | 0,1515 | 0,4515 |
| 22      | 0,5396 | 0,1560 | 0,4545 |
| 23      | 0,5442 | 0,1519 | 0,4625 |
| 24      | 0,5198 | 0,1540 | 0,4324 |
| 25      | 0,5066 | 0,1500 | 0,4195 |
| average | 0,5262 | 0,1492 | 0,4429 |
| S.D.    | 0,0624 | 0,0376 | 0,0673 |

95 % C.I. from  
bootstrapping over loci.

replications performed: 1000

|       | F      | theta P | f      |
|-------|--------|---------|--------|
| Upper | 0,6547 | 0,2198  | 0,5902 |
| Lower | 0,4149 | 0,0828  | 0,3218 |

APÊNDICE 10. Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos dados de microssatélites das populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) pelo TFPGA.

Data set contains genotypes of individuals sampled from populations.

Organism Type: Diploid

Marker Type: Codominant

#### TESTS FOR HARDY-WEINBERG EQUILIBRIUM

Analysis of each population

Population 1 Locus 1

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 1 1      | 8        | 8,6786   |
| 1 *      | 11       | 9,6429   |
| * *      | 2        | 2,6786   |

Exact Probability (Haldane 1954)

p = 0,6645

Population 1 Locus 2

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 1 1      | 6        | 6,0000   |
| 1 *      | 0        | 0,0000   |
| * *      | 0        | 0,0000   |

Only 1 allele at locus. Calculations not performed.

Population 1 Locus 3

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 1 1      | 13       | 8,8947   |
| 1 *      | 0        | 8,2105   |
| * *      | 6        | 1,8947   |

Exact Probability (Haldane 1954)

p = 0,0000

| Population 1 Locus 4 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 2 2                  | 14       | 14,4500  |
| 2 *                  | 6        | 5,1000   |
| * *                  | 0        | 0,4500   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 1,0000$

| Population 1 Locus 5 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 2 2                  | 19       | 17,1905  |
| 2 *                  | 0        | 3,6190   |
| * *                  | 2        | 0,1905   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0019$

| Population 1 Locus 6 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 2 2                  | 17       | 16,2976  |
| 2 *                  | 3        | 4,4048   |
| * *                  | 1        | 0,2976   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,2345$

| Population 1 Locus 7 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 2 2                  | 8        | 4,0000   |
| 2 *                  | 0        | 8,0000   |
| * *                  | 8        | 4,0000   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0000$

| Population 1 Locus 8 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 2 2                  | 9        | 5,2500   |
| 2 *                  | 3        | 10,5000  |
| * *                  | 9        | 5,2500   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0014$

| Population 1 Locus 9 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 1 1                  | 18       | 15,4286  |
| 1 *                  | 0        | 5,1429   |
| * *                  | 3        | 0,4286   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0003$

| Population 1 Locus 10 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 12       | 9,6000   |
| 2 *                   | 0        | 4,8000   |
| * *                   | 3        | 0,6000   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0008$

| Population 1 Locus 11 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 16       | 15,4286  |
| 2 *                   | 4        | 5,1429   |
| * *                   | 1        | 0,4286   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,3380$

| Population 1 Locus 12 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 12       | 10,7143  |
| 2 *                   | 6        | 8,5714   |
| * *                   | 3        | 1,7143   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,2733$

| Population 1 Locus 13 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 1 1                   | 21       | 21,0000  |
| 1 *                   | 0        | 0,0000   |
| * *                   | 0        | 0,0000   |

-----  
 Only 1 allele at locus. Calculations not performed.

| Population 1 Locus 14 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 1 1                   | 9        | 6,8571   |
| 1 *                   | 6        | 10,2857  |
| * *                   | 6        | 3,8571   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0744$

| Population 1 Locus 15 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 1 1                   | 21       | 21,0000  |
| 1 *                   | 0        | 0,0000   |
| * *                   | 0        | 0,0000   |

-----  
 Only 1 allele at locus. Calculations not performed.

| Population 1 Locus 16 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 1 1                   | 10       | 5,2500   |
| 1 *                   | 1        | 10,5000  |
| * *                   | 10       | 5,2500   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0000$

| Population 1 Locus 17 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 3 3                   | 6        | 2,7692   |
| 3 *                   | 0        | 6,4615   |
| * *                   | 7        | 3,7692   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0002$

| Population 1 Locus 18 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 12       | 10,0119  |
| 2 *                   | 5        | 8,9762   |
| * *                   | 4        | 2,0119   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0501$

| Population 1 Locus 19 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 18       | 16,2976  |
| 2 *                   | 1        | 4,4048   |
| * *                   | 2        | 0,2976   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0094$

| Population 1 Locus 20 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 21       | 21,0000  |
| 2 *                   | 0        | 0,0000   |
| * *                   | 0        | 0,0000   |

-----  
 Only 1 allele at locus. Calculations not performed.

| Population 1 Locus 21 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 3 3                   | 5        | 4,2250   |
| 3 *                   | 3        | 4,5500   |
| * *                   | 2        | 1,2250   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,4799$

| Population 1 Locus 22 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 3 3                   | 7        | 4,2976   |
| 3 *                   | 5        | 10,4048  |
| * *                   | 9        | 6,2976   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0250$

| Population 1 Locus 23 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 3        | 3,0476   |
| 2 *                   | 10       | 9,9048   |
| * *                   | 8        | 8,0476   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 1,0000$

| Population 1 Locus 24 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 3 3                   | 15       | 13,4737  |
| 3 *                   | 2        | 5,0526   |
| * *                   | 2        | 0,4737   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0340$

| Population 1 Locus 25 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 11       | 7,5625   |
| 2 *                   | 0        | 6,8750   |
| * *                   | 5        | 1,5625   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0001$

| Population 2 Locus 1 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 3 3                  | 8        | 6,3684   |
| 3 *                  | 6        | 9,2632   |
| * *                  | 5        | 3,3684   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,1607$

| Population 2 Locus 2 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 1 1                  | 1        | 1,0000   |
| 1 *                  | 0        | 0,0000   |
| * *                  | 0        | 0,0000   |

-----

Only 1 allele at locus. Calculations not performed.

| Population 2 Locus 3 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 1 1                  | 5        | 4,0139   |
| 1 *                  | 7        | 8,9722   |
| * *                  | 6        | 5,0139   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,3698$

| Population 2 Locus 4 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 2 2                  | 5        | 5,2632   |
| 2 *                  | 10       | 9,4737   |
| * *                  | 4        | 4,2632   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 1,0000$

| Population 2 Locus 5 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 2 2                  | 18       | 18,0132  |
| 2 *                  | 1        | 0,9737   |
| * *                  | 0        | 0,0132   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)

$p = 1,0000$

| Population 2 Locus 6 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 1 1                  | 5        | 4,7500   |
| 1 *                  | 9        | 9,5000   |
| * *                  | 5        | 4,7500   |

-----  
Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 1,0000$

| Population 2 Locus 7 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 2 2                  | 5        | 2,8125   |
| 2 *                  | 5        | 9,3750   |
| * *                  | 10       | 7,8125   |

-----  
Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0525$

| Population 2 Locus 8 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 1 1                  | 0        | 1,8906   |
| 1 *                  | 11       | 7,2188   |
| * *                  | 5        | 6,8906   |

-----  
Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0949$

| Population 2 Locus 9 |          |          |
|----------------------|----------|----------|
| genotype             | observed | expected |
| 1 1                  | 16       | 16,0000  |
| 1 *                  | 0        | 0,0000   |
| * *                  | 0        | 0,0000   |

-----  
Only 1 allele at locus. Calculations not performed.

| Population 2 Locus 10 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 3 3                   | 7        | 5,0625   |
| 3 *                   | 4        | 7,8750   |
| * *                   | 5        | 3,0625   |

-----  
Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0562$

| Population 2 Locus 11 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 14       | 13,3472  |
| 2 *                   | 3        | 4,3056   |
| * *                   | 1        | 0,3472   |

-----  
Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,2727$

| Population 2 Locus 12 |          |          |
|-----------------------|----------|----------|
| genotype              | observed | expected |
| 2 2                   | 9        | 8,0000   |
| 2 *                   | 6        | 8,0000   |
| * *                   | 3        | 2,0000   |

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,3109$

Population 2 Locus 13  
 genotype observed expected  
 1 1 18 18,0000  
 1 \* 0 0,0000  
 \* \* 0 0,0000

-----  
 Only 1 allele at locus. Calculations not performed.

Population 2 Locus 14  
 genotype observed expected  
 2 2 9 8,8947  
 2 \* 8 8,2105  
 \* \* 2 1,8947

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 1,0000$

Population 2 Locus 15  
 genotype observed expected  
 1 1 20 20,0000  
 1 \* 0 0,0000  
 \* \* 0 0,0000

-----  
 Only 1 allele at locus. Calculations not performed.

Population 2 Locus 16  
 genotype observed expected  
 2 2 15 12,5000  
 2 \* 0 5,0000  
 \* \* 3 0,5000

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0004$

Population 2 Locus 17  
 genotype observed expected  
 2 2 10 6,6667  
 2 \* 0 6,6667  
 \* \* 5 1,6667

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0001$

Population 2 Locus 18  
 genotype observed expected  
 3 3 18 17,0526  
 3 \* 0 1,8947  
 \* \* 1 0,0526

-----  
 Exact Probability (Haldane 1954)  
 $p = 0,0270$

Population 2 Locus 19  
 genotype observed expected  
 2 2 16 14,2222  
 2 \* 0 3,5556

\* \*            2        0,2222

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
p = 0,0026

Population 2 Locus 20

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 2 2      | 12       | 7,2000   |
| 2 *      | 0        | 9,6000   |
| * *      | 8        | 3,2000   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
p = 0,0000

Population 2 Locus 21

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 2 2      | 8        | 3,7647   |
| 2 *      | 0        | 8,4706   |
| * *      | 9        | 4,7647   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
p = 0,0000

Population 2 Locus 22

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 2 2      | 6        | 5,5125   |
| 2 *      | 9        | 9,9750   |
| * *      | 5        | 4,5125   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
p = 0,6699

Population 2 Locus 23

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 2 2      | 10       | 9,8000   |
| 2 *      | 8        | 8,4000   |
| * *      | 2        | 1,8000   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
p = 1,0000

Population 2 Locus 24

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 3 3      | 10       | 7,1429   |
| 3 *      | 0        | 5,7143   |
| * *      | 4        | 1,1429   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
p = 0,0003

Population 2 Locus 25

| genotype | observed | expected |
|----------|----------|----------|
| 1 1      | 7        | 4,6875   |
| 1 *      | 1        | 5,6250   |
| * *      | 4        | 1,6875   |

-----

Exact Probability (Haldane 1954)  
p = 0,0061

APÊNDICE 11. Análise de distância pelo coeficiente de Nei78 dos dados de microssatélites das populações de teosinto (Canguçu e Monte Bonito) pelo TFPGA.

Data set contains genotypes of individuals sampled from populations.

Organism Type: Diploid

Marker Type: Codominant

GENETIC DISTANCES

NEI'S (1972/1978) IDENTITIES/DISTANCES

Nei's original (1972) identity

Population 1 2

1 \*\*\*\*\*

2 0,8680 \*\*\*\*\*

Nei's original (1972) distance

Population 1 2

1 \*\*\*\*\*

2 0,1415 \*\*\*\*\*

Nei's unbiased (1978) identity

Population 1 2

1 \*\*\*\*\*

2 0,8831 \*\*\*\*\*

Nei's unbiased (1978) distance

Population 1 2

1 \*\*\*\*\*

2 0,1243 \*\*\*\*\*

## 8 VITA

Tatiana de Freitas Terra, filha de Maria Elena de Freitas e Olimar dos Santos Terra, nasceu em 25 de janeiro de 1979, em Porto Alegre (RS). Realizou o ensino fundamental na Escola Estadual de Ensino Fundamental Dr. Ferreira de Abreu e o ensino médio no Colégio Estadual Dom João Becker, ambos localizados em Porto Alegre (RS).

Iniciou sua carreira acadêmica em agosto de 1997, quando ingressou no curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas (PUCRS) e o concluiu em dezembro de 2001. De maio de 2000 a dezembro de 2001, atuou como bolsista de Iniciação Científica da FAPERGS, no Departamento de Genética da UFRGS. Em março de 2002, ingressou no PPG – Fitotecnia (UFRGS), cursou o mestrado como bolsista da CAPES, defendeu a dissertação: “Análises citogenéticas e moleculares em populações de milho (*Zea mays* L.), teosinto (*Zea mexicana* L.) e em híbridos entre as duas espécies” e obteve o título de Mestre em Fitotecnia, em agosto de 2004. Em março de 2005, ingressou como aluna de doutorado do PPG – Fitotecnia (UFRGS), cursou com bolsa da CAPES, defendeu a tese: “Variabilidade genética em populações de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) visando à contribuição para o melhoramento genético do milho (*Zea mays* subsp. *mays*)” e obteve o título de Doutora em Fitotecnia, em março de 2009.