

**BC/14783**  
**IB/81126**



81126

**"O PAPEL DA DISPERSÃO DO TEOSINTE NA DOMESTICAÇÃO DO MILHO"**

**ANA BEATRIZ FERREIRA TORREÃO**

**Orientador: Prof. Dr. William José da Silva**

*Este exemplar corrigido e redação  
final de Tese defendida pela candidata  
ANA BEATRIZ FERREIRA TORREÃO e aprovada  
pela Comissão Julgadora  
CAMPINAS 23 de Setembro de 1991  
William J. L.*

Dissertação de Mestrado a ser  
apresentada à Comissão de Pós-Graduação  
do Instituto de Biologia - UNICAMP, como  
requisito para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas.  
Área de concentração: Genética.

**Campinas - SP**

**1991**

T/UNICAMP

T635  
p



UNIDADE	IB/112
N.º CHAMADA	T635p
V. _____	EX. _____
TOMBO BC	14783
PROC.	308191
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PRECO	Gr\$ 8.000,00
DATA	25/10/91
N.º CPD	

CM = 000 14361-2

*Comprovante de  
no Banco Somente Fica 9/2*

**Pelo amor e compreensão,**

**Aos meus pais, Ruy e Maria de Jesus**

**A Menotti, meu companheiro e amigo**

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. William José da Silva pela orientação segura e competente, e em especial pela sua amizade e apoio.
- Aos Profs. Drs. Paulo Soderro Martins, George John Shepherd e Sérgio Furtado dos Reis pelo exame desse trabalho e valiosas sugestões.
- Ao Dr. Herculano P. Medina Filho pela concessão dos materiais e do espaço físico do Laboratório de Eletroforese da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas, e à Doutoranda Rosa Maria Lizana Ballvé pela inestimável ajuda nas análises eletroforéticas.
- À Profa. Maria Marlúcia Ferreira Corrêa, pela sua confiança, amizade e incentivo.
- A Menotti pelo suporte em informática e "dicas" muito oportunas.
- Ao Sr. Bento Libânio, Da. Cida e Da. Gê por toda a força que nos dão, e carinho com que nos recebem no Barracão.
- As colegas Cristiane, Luciane, Patrícia, Mirian, Fátima, Maria Elisa, Raquel, Paula e Geralda pela sua participação, interesse e incentivo.
- À Nilma pela sua amizade e convivência nesses anos.
- Aos meus irmãos Pedro, Rosa Amália, Maria Helena, Ruy, Paulo e Andréa que sempre torceram por mim.
- À Elizabeth Bilo pelo auxílio na preparação das amostras para as análises eletroforéticas e pela amizade.

- Ao Maurício pela paciência e boa vontade ao me ajudar no "pesado".
- Ao Olivetti sempre gentil.
- A todos os amigos do Barracão e da Secretaria de Pós-Graduação do curso de Genética.
- A todos os amigos que tive oportunidade de fazer em São Luís e Campinas.
- À CAPES e FAEP-UNICAMP pelo suporte financeiro.

## CONTEÚDO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Origem da agricultura e domesticação de plantas.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Relações filogenéticas dentro do gênero Zea.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. Domesticação do milho.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Taxa de cruzamento.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5. Efeitos do fotoperíodo e temperatura em milho e         teosinte.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Caracterização do germoplasma.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Condução dos lotes experimentais.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Dados coletados.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1. Fenologia reprodutiva.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.2. Características gerais das populações.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4. Estimativa de taxa de cruzamento.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4.1. Metodologia de eletroforese.....</b>	<b>42</b>
<b>-Preparação das amostras.....</b>	<b>42</b>
<b>-Preparo do gel.....</b>	<b>43</b>
<b>-Eletroforese.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5. Experimento de germinação.....</b>	<b>44</b>

<b>4. Resultados e discussão.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Caracterização do germoplasma.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.1. Análise do padrão de florescimento.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.2. Análise das características das populações.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.3. Análise canônica e fenética.....</b>	<b>72</b>
<b>4.2. Estimativa de taxa de cruzamento.....</b>	<b>84</b>
<b>4.3. Dormência em teosintes.....</b>	<b>87</b>
<b>4.4.0 papel da resposta de Zea a mudanças no ambiente     e domesticação do milho.....</b>	<b>91</b>
<b>4.5. Teorias de Galinat e de Iltis e o significado da     presente contribuição na elucidação da evolução     do milho.....</b>	<b>101</b>
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>106</b>
<b>6. Resumo.....</b>	<b>108</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>110</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>112</b>

## 1. INTRODUÇÃO.

Teosinte e milho pertencem à tribo Andropogoneae, família Gramineae. Vários trabalhos sobre o parentesco dessas duas gramíneas têm sido feitos nos últimos 40 anos. Estudos de biosistemática parecem sugerir que o teosinte é o provável ancestral do milho (de Wet & Harlan, 1972; Beadle, 1980; Iltis, 1983a, 1983b). Apenas alguns dados arqueológicos, embora contraditórios, lançam certas dúvidas sobre essa hipótese (de Wet & Harlan, 1972; Randolph, 1976).

O teosinte possui larga distribuição nas vegetações naturais do rio Balsas (México) e na região de Huehuetenango (Guatemala), compondo populações marginais aos campos de cultivo de milho, em altitudes que vão de 800 a 2100 m, com clima subtropical e duas estações bem definidas. Registros fósseis datados de 900 a 400 A. C., dão evidências de que suas populações foram amplamente distribuídas no México e na América Central (Wilkes, 1967).

O teosinte possui nós conspicuos ao longo do colmo, folhas dísticas, uma folha por nó, com bainha envolvendo o colmo e ramificações simples que podem ou não se desenvolver em cada nó. Em populações naturais, no México e Guatemala, essas ramificações laterais ocorrem somente nos nós superiores, mas em latitudes mais elevadas podem ocorrer ao longo de todo o colmo (Wilkes, 1967).

Milho e teosinte, às vezes, podem ser tão semelhantes que na fase vegetativa, ao crescerem juntos em certas localidades do México, são praticamente indistinguíveis, podendo apenas ser diferenciados na

época do florescimento. Características comuns a essas duas gramíneas têm contribuído para o fortalecimento do conceito de convergência entre a origem do milho e a origem do teosinte. Entre elas, pode-se citar o mesmo número de cromossomos ( $n=10$ ) nos dois taxa, os cruzamentos entre eles produzem descendência com elevada fertilidade, os híbridos revelam pareamento cromossômico em quase sua totalidade e o "crossing-over" ocorre normalmente, exceto em casos de inversão. O fluxo gênico entre milho e teosinte parece ocorrer em ambos os sentidos (Mangelsdorf, 1974), entretanto, Fridman (1987) demonstrou a existência de mecanismos que limitam o fluxo gênico entre representantes do tipo selvagem e o tipo domesticado.

Embora não se tenha provas definitivas, existem evidências circunstanciais de que a introgressão desempenhou forte influência na evolução do milho a partir do teosinte, em decorrência da hibridação, retrocruzamento e seleção para estabilização (Stebbins, 1974).

A divisão taxonômica dos teosintes em duas Seções, proposta por Doebley & Iltis (1980), é baseada na morfologia das inflorescências masculinas e na forma da cúpula que reveste o fruto. Trabalhos recentes, fundamentados em análises de proteínas das sementes e de isoenzimas de plântulas (Mastenbroek et al., 1981; Doebley et al., 1984), sugerem a necessidade de pequenos ajustes naquela classificação.

No gênero *Zea* tem sido detectado por vários autores (Wilkes, 1967; Beadle, 1980; Fridman, 1987) que o teosinte tem maior sensibilidade a variações do fotoperíodo que o milho, o que resulta em alterações significativas em sua fisiologia, e conseqüentemente em sua

arquitetura.

Pesquisas envolvendo resposta de germoplasma de milho ao fotoperíodo e temperatura realizadas por Wellhausen et al. (1952, 1958), McBryde (1947) citado por Wellhausen (1958), Stevenson & Goodman (1972), Bonaparte (1975), Allison & Daynard (1979) e Goldsworthy et al. (1974a, 1974b), mostram que os dois efeitos são correspondentes, ambos induzindo o florescimento.

Milho e teosinte, sendo taxa cultivado e selvagem, constituem excelente material biológico para se investigar aspectos de interesse evolutivo, que podem ter ocorrido ao longo da domesticação. A coleção de teosintes do Laboratório de Genética de Milho da UNICAMP, engloba as coleções do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), do Instituto Nacional de Investigações Agrárias (INIA), ambos sediados no México, e a do Laboratório do professor Hugh Iltis da Universidade de Wisconsin. Trata-se portanto, de uma das mais completas coleções vivas do provável ancestral do milho. A possibilidade de se cultivar esse germoplasma em Campinas (SP), à latitude de 22° 54' sul, em regime de dias curtos (semeadura em Fevereiro) e dias longos (semeadura em Outubro), sem restrições de temperatura, foi um fator importante para estimular a execução desse trabalho. Teve-se desse modo, condições favoráveis para se estudar o papel da dispersão do teosinte de elevadas altitudes para regiões mais baixas, através da sua resposta ao comprimento do dia. Pois a fotossensibilidade simula efeitos semelhantes ao da altitude, induzindo o florescimento, fator esse que pode ter sido muito importante na domesticação do milho e na geração da variabilidade

genética encontrada no cereal. Os seguintes aspectos foram abordados no presente trabalho:

1. Estudo de alterações morfofisiológicas de teosintes e milho, quando cultivados em duas condições de fotoperíodo contrastantes, dias curtos e dias longos, simulando condições de baixa e alta altitude, respectivamente.

2. Estudo da biologia reprodutiva das plantas nas duas situações de regime de luz.

3. Estudo do efeito do comprimento do dia na mudança da arquitetura das plantas e sua implicação na taxa de cruzamento natural de teosintes e milho.

4. Estudo das relações fenéticas entre as populações de teosinte e milho nas duas condições de fotoperíodo.

5. Finalmente procurou-se, através da resposta dos tipos selvagens e domesticado ao fotoperíodo, inferir sobre o efeito da migração dos teosintes de mais alta para mais baixa altitude na domesticação do milho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1. ORIGEM DA AGRICULTURA E DOMESTICAÇÃO DE PLANTAS.

Estima-se que o homem deu início à prática da agricultura acerca de 7000 a 10000 anos atrás em várias partes do Novo e Velho Mundo, quando passou de caçador nômade e coletor a ter hábito sedentário, e a constituir agrupamentos em áreas propícias à domesticação de diferentes espécies de animais e plantas. Os primeiros agricultores cultivavam simultaneamente diferentes espécies, gêneros e famílias de plantas pertencentes aos grupos de cereais, leguminosas, tubérculos, oleaginosas e plantas fibrosas. Como processo, a domesticação foi efetuada em áreas restritas, onde foi possível analisar registros de sua ocorrência, muito embora não estejam totalmente elucidados os eventos relacionados às causas e finalidades dessa nova atividade do homem (Harlan, 1971, 1975; Zeven & de Wet, 1982; Ashri, 1989). Não se sabe ao certo quais os fatores ou o fator crucial que teria levado o homem a cultivar plantas. Entre as inúmeras hipóteses figuram questões religiosas ou rituais de feitiçaria, o aprimoramento de habilidades previamente adquiridas em outras atividades e que possibilitariam o início da experimentação, o hábito sedentário em regiões de fácil acesso, com suprimento de água adequado, e finalmente a grande diversidade de populações vegetais que ofereceram consideráveis reservas de genes a serem trabalhadas pela seleção artificial em proveito de comunidades humanas (Harlan, 1975;

Zeven & de Wet, 1982).

De Candolle e Vavilov foram os primeiros pesquisadores que deram início aos estudos fitogeográficos de plantas cultivadas. O primeiro se preocupou em desenvolver uma metodologia de integração de evidências da domesticação, reunindo informações acerca da biologia e das condições ambientais dos seus locais de ocorrência. Por sua vez, Vavilov desenvolveu um método denominado de fitogeografia diferencial, que consistia basicamente na busca da variabilidade existente entre e dentro das populações vegetais de interesse, com posterior mapeamento dessa variabilidade. Com essas primeiras contribuições, passou-se a considerar dois pontos importantes de referência, o centro de diversidade onde ocorre a máxima concentração de variabilidade das plantas envolvidas na domesticação e o centro de origem, local da passagem dos tipos selvagens a domesticados, com registros históricos dessa transformação (Harlan, 1971, 1975).

Harlan (1971) procurou enfatizar a necessidade de se fazer investigações aprofundadas, envolvendo aspectos de Arqueobotânica, Palinologia, Biosistemática, Genética, Citogenética, Taxonomia Numérica, Morfologia, Ecologia, Geografia, História, Arqueologia, Linguística, Religião, Geologia, Hidrologia e outras mais que possam auxiliar no esclarecimento de onde, quando e como se processou a domesticação das plantas cultivadas, aproximando-se em muito da metodologia seguida por de Candolle no final do século passado, porém obviamente mais aprimorada. Esse mesmo autor propôs um modelo para descrever a origem da Agricultura, segundo o qual o cultivo de plantas foi iniciado de modo independente, a uma mesma época, em três áreas do

planeta, às quais denominou de centro de origem. São áreas restritas onde se tem registros de ocorrência do processo. Propôs ainda, a existência de três grandes áreas, denominando-as de não-centro, referentes a locais de distribuição de plantas domesticadas, onde ainda não se coletou elementos suficientes para se estimar quando e onde aconteceu a domesticação. Dessa maneira, tem-se os centros de origem do Oriente Próximo, da China e o da América Central, e os não-centro de origem da África, do Sudeste Asiático - Sul do Pacífico e da América do Sul.

Levando-se em consideração as bases genéticas das características modificadas pela domesticação, processo que sugere a existência de alterações evolutivas, em que as características alteradas devem se perpetuar nas gerações seguintes, constata-se de um modo geral, que as diferenças genéticas entre as raças selvagens e as cultivadas não parecem ser muito grandes. Nessa fase as barreiras genéticas, comuns ao processo de especiação, estão ausentes, permitindo a ocorrência de cruzamentos entre os tipos selvagens e os cultivados aparentados. Com isso, as duas formas são prontamente recuperadas em decorrência de retrocruzamentos. Esse fato demonstra que os genes envolvidos ou são poucos, ou então acham-se ligados em blocos em poucos cromossomos, caracterizando um mecanismo de herança simples (Harlan et al., 1973).

Estando a domesticação relacionada a eventos genéticos simples, sem envolvimento com características poligênicas, fica claro que o homem ao iniciar o cultivo das sementes que coletava de plantas selvagens, acionou pressões de seleção automática inconscientemente

sobre essas populações de plantas, provocando respostas quase imediatas, e gerando grandes modificações em características adaptativas. A primeira delas, parece consistir na perda da deiscência dos frutos ou perda da fragmentação da ráquis de sustentação dos grãos, para o caso particular dos cereais, à qual se atribui ser a etapa inicial para a domesticação. A seguir, o homem iniciou as pressões de seleção artificial sobre as plantas cultivadas, provocando modificações de caráter secundário, e que visavam um aprimoramento do produto a ser consumido. Essa seleção consciente estaria desse modo associada a um interesse particular, para que fossem atendidos os objetivos mais variados, desde a obtenção de frutos, sementes ou outras partes das plantas com maior tamanho, aumento da produtividade, alteração da cor e sabor dos frutos, visando o melhoramento da qualidade do produto a ser consumido (Harlan et al., 1973).

As síndromes adaptativas que surgiram inicialmente com a seleção automática, pelo simples fato de se plantar seguidamente as sementes coletadas, são consideradas consequências da domesticação. E representam, portanto, mudanças evolutivas dinâmicas, que dão oportunidade ao aparecimento de formas variantes da espécie de planta. Algumas dessas características foram sugeridas por Harlan et al. (1973), Zeven & de Wet (1982) e Ashri (1989), entre as quais, as mais evidentes são:

- 1- Perda da deiscência, ou de mecanismos naturais de dispersão e de dormência.

- 2- Aumento do tamanho de órgãos das plantas, como raiz, caule, folhas ou sementes, de interesse imediato do homem.

3- Redução do número de inflorescências, com aumento do tamanho das mesmas.

4- Conversão do ciclo perene para anual, em alguns casos.

5- Aumento da produtividade.

6- Diminuição da sensibilidade às alterações de fotoperíodo.

7- Passagem para crescimento determinado e aparecimento da dominância apical.

8- Obtenção de grãos e sementes expostas.

9- Modificação do sistema reprodutivo.

10- Maior uniformidade na maturação entre e dentro das plantas.

11- Diminuição do teor de proteínas e aumento de carboidratos nas sementes.

12- Diminuição da habilidade competitiva fora das condições de cultivo estabelecidas pelo homem.

13- Desaparecimento de estruturas especializadas para a defesa na natureza, como pêlos, espinhos e acúleos.

Como essas características são consideradas atributos de espécies de plantas domesticadas seria esperado, obviamente, que deixassem de ocorrer em populações de espécies selvagens.

## 2.2. RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DENTRO DO GÊNERO *Zea*.

Os teosintes, taxa selvagens, constituem material valioso para a investigação das relações de parentesco com o milho, taxon cultivado, servindo não só a estudos de genética e evolução, mas também a programas de melhoramento (Galinat, 1988).

A classificação dos teosintes feita por Wilkes (1967) baseou-se no estudo de populações geográficas de diferentes raças, cada uma com suas características morfológicas peculiares. O autor não apresentou as raças de teosinte de maneira formal, provavelmente por acreditar que as diferenças entre as mesmas eram mais um reflexo de vários níveis de introgressão de milho, do que resultado de adaptações aos tipos de meios onde vivem. As descrições das características dessas raças têm que ser consideradas com certas restrições, já que foram feitas, em parte, bem fora do ambiente natural, no Estado de Massachusetts (USA). Nessas condições de alta latitude, as raças Balsas e Guatemala foram descritas, por exemplo, como possuidoras de numerosos perfilhos, quando em seus habitats nativos perfilham raramente.

Doebley & Iltis (1980), por outro lado, classificaram os taxa do gênero *Zea* numa sequência que procurou refletir suas relações evolutivas. Esse sistema está baseado em características morfológicas e ecológicas dos teosintes, com referência especial às variações das espiguetas em inflorescências estaminadas, o que resultou na divisão do gênero *Zea* em duas Seções. A Seção Luxuriantes abrangendo as

espécies *Z. diploperennis*, *Z. perennis* e *Z. luxurians*, e a Seção *Zea* com apenas a espécie *Z. mays*, e as subespécies, *mexicana*, *parviglumis* e *mays*. A subespécie *parviglumis* ficou constituída de duas variedades: *parviglumis*, propriamente dita, e *huehuetenanguensis*. Recentemente, Doebley (1990b) propôs a elevação da variedade *huehuetenanguensis* para a categoria de subespécie, perfazendo um total de quatro subespécies dentro da espécie *Z. mays* (*sensu lato*). Tal tratamento foi justificado pelos dados contrastantes desse taxon quanto a análises isoenzimáticas, morfológicas e dos genomas nuclear e citoplasmático. Essas diferenças seriam provocadas por fatores como a origem híbrida da variedade *huehuetenanguensis*, ou pela mesma ter sofrido uma severa deriva genética, que teria alterado o seu genoma nuclear num período muito curto de tempo.

Enquanto o trabalho de Smith et al. (1981), utilizando análises de 27 caracteres morfológicos comparados entre si, concorda com a classificação de Doebley & Iltis (1980), outros relatos baseados em posições de "knobs" comossômicos, cromossomos B e isoenzimas discordam dessa divisão (Smith et al., 1982; Smith et al., 1984; Smith et al., 1985), sugerindo a necessidade de se investigar novas variáveis que possam servir significativamente à separação dos taxa de *Zea*.

Outros trabalhos continuaram a questionar a classificação de Doebley & Iltis (1980), como o de Mastenbroek et al. (1981). Esses autores utilizaram análises de padrões eletroforéticos de proteínas das sementes e de isoenzimas de plântulas de representantes das Seções *Zea* e *Luxuriantes*, para testar se tais características bioquímicas

servem como variáveis para discriminar os componentes do gênero *Zea* em unidades taxonômicas. Os resultados da análise de proteínas das sementes mostraram concordância com a classificação de Doebley & Iltis (1980). Porém, as análises eletroforéticas das isoenzimas álcool desidrogenase, esterase e indofenol oxidase, não concordaram com essa classificação, demonstrando ser menos indicadas como atributos para discriminação taxonômica dos materiais testados. As razões para isso foram apontadas como a quantidade limitada de informação genética testada, a tendência das isoenzimas de serem variáveis entre os diferentes tecidos das plântulas e até mesmo o efeito de diferentes estágios de desenvolvimento nos padrões enzimáticos analisados. Tais fatores poderiam ter mascarado a variação isoenzimática existente nos taxa estudados.

Com o objetivo de pesquisar o grau de variação genética, o fluxo gênico entre populações e sugerir relações filogenéticas dentro do gênero *Zea*, Doebley et al. (1984) fizeram uso da técnica de eletroforese para 12 isoenzimas diferentes, totalizando 20 locos gênicos. Quanto à variação genética, *Z. luxurians* e *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* demonstraram possuir o menor grau de variação, enquanto a subespécie *Z. mays mexicana* e a espécie *Z. diploperennis* tiveram a maior variabilidade. Em relação à introgressão, demonstraram ocorrer contaminação da raça Central Plateau, *Z. mays mexicana*, por milho. As espécies *Z. luxurians* e *Z. diploperennis* também apresentaram isoenzimas típicas de milho. E finalmente, quanto à filogenia das populações estudadas, *Z. luxurians*, *Z. diploperennis* e *Z. perennis* mostraram ser semelhantes entre si e

distantes dos demais taxa, estando, portanto, bem agrupados na Seção Luxuriantes. Puderam detectar ainda elementos que permitem a separação dos teosintes da espécie *Z. mays* em dois grupos, um que ocorre naturalmente em áreas altas, pertencentes à *ssp mexicana*, e outro em regiões de altitudes médias, representantes da *ssp parviglumis*. É interessante notar que as formas de altitudes médias foram mais similares isoenzimaticamente ao milho, muito embora os teosintes das altitudes mais elevadas, *Z. mays mexicana*, sejam morfológicamente mais parecidos com o cereal domesticado.

Nos dias atuais, é evidente a necessidade de um maior aprofundamento na utilização de técnicas bioquímicas e moleculares para que se chegue a um melhor entendimento da sistemática das gramíneas pertencentes ao gênero *Zea*. Doebley (1989) apontou vantagens de se utilizar marcadores moleculares nos estudos de introgressão para inferir sobre as relações filogenéticas entre espécies aparentadas. Tais marcadores tendem a ser neutros, e portanto menos sujeitos a convergir num mesmo ambiente, como ocorre com as características morfológicas. Além do que permitem examinar a ocorrência de introgressão para os genomas nuclear e citoplasmático, que são herdados de modo independente, como foi comprovado por Timothy et al. (1979). Esses pesquisadores estudaram as variações do DNA das organelas citoplasmáticas, mitocôndria e cloroplasto, utilizando-as para estabelecer relações sistemáticas entre milho, teosintes anuais e teosinte perene. Foi possível separá-los em 5 grupos distintos, milho e Nobogame, Central Plateau e Chalco, Balsas e Huehuetenango, Perene e Guatemala. Discriminação semelhante a essa foi feita por Doebley &

Iltis (1980), como já vimos, baseada em características morfológicas das inflorescências masculinas.

Para que se possa levar a cabo esses estudos, deve-se tomar como ponto de partida o fato de que é evidente o fluxo de genes na natureza entre o milho e seus parentes mais próximos, os teosintes. Considerando que esses taxa já são bem estudados, o uso de marcadores moleculares pode servir para complementar as informações acumuladas, contribuindo para confirmar ou refutar os resultados obtidos através de métodos convencionais de análise filogenética. Doebley (1990a) analisando a constituição aloenzimática e o DNA de cloroplasto de plantas de milho e teosintes, coletadas do mesmo campo, confirmou resultados de outros autores que sugeriram a existência de um fluxo gênico entre os mesmos com base em características morfológicas. Ficou evidenciado que embora a troca de genes possa ser feita nas duas direções, ela ocorre em baixos níveis, pois o germoplasma cultivado e o selvagem possuem frequências gênicas distintas.

Mais recentemente, as investigações de sistemática molecular têm dado suporte à hipótese de que o milho é uma forma domesticada de teosinte, sugerindo ainda que *Z. mays* ssp *parviglumis* seja o provável ancestral do taxon cultivado (Doebley, 1990b).

### 2.3. DOMESTICAÇÃO DO MILHO.

Muitas hipóteses já foram levantadas acerca da domesticação do milho, e ainda hoje o assunto é motivo de controvérsias. Dúvidas ainda existem sobre como, quando e onde aconteceu o processo de domesticação. Atualmente acredita-se que o teosinte seja o provável ancestral do milho (Beadle, 1980; Iltis, 1983a, 1983b; Doebley, 1990b).

Embora as diferenças entre teosinte e milho sejam prontamente identificáveis e descontínuas, pode-se visualizar etapas evolutivas que devem ter ocorrido na passagem do tipo selvagem para o domesticado. Dentre os parâmetros de comparação, aqueles mais evidentes se referem às inflorescências femininas, as espigas. Se por um lado, o tipo selvagem possui espigas dísticas, fragmentáveis, com espiguetas pediceladas estéreis e glumas muito duras protegendo suas pequenas cariopses, o tipo domesticado, por outro lado, se caracteriza por ter espigas polísticas, não-fragmentáveis, com ambas espiguetas férteis, glumas curtas e frágeis e por fim, grandes cariopses expostas (Harlan, 1975). As conversões de um estado para outro parecem não ser tão complexas, estando sob controle genético simples de um ou poucos genes, como foi demonstrado por Galinat (1971) através da obtenção de híbridos de teosinte e milho, com posterior recuperação dos tipos parentais ao se proceder os retrocruzamentos aos tipos parentais.

Para os autores que pesquisam a domesticação do milho, está bem claro que o processo de alguma forma deve estar estreitamente

relacionado com a origem e evolução dos teosintes. Na tentativa de elucidar os passos seguidos até a obtenção do tipo cultivado, algumas teorias têm sido propostas. A primeira delas defende a hipótese de evolução divergente para o milho, teosinte e tripsacum a partir de um ancestral comum (Weatherwax, 1935; Randolph, 1955; citados por Goodman, 1987). A segunda é bastante controversa, e diz que o teosinte é produto da hibridização de um milho primitivo, ora extinto, e tripsacum (Mangelsdorf & Reeves, 1939, citados por Goodman, 1987; Mangelsdorf, 1974). E finalmente a terceira que sugere que o progenitor do milho é o teosinte, atribuindo o processo à ação da seleção artificial. Essa última é a idéia que tem encontrado maior suporte, devido ao acúmulo de evidências que lhe são favoráveis (Beadle, 1980; Galinat, 1971, 1983, 1985; Iltis, 1983a, 1983b, 1986).

Segundo Goodman (1987), a segunda e a terceira têm embasamento na primeira, e concordam quanto a estreita relação entre teosinte e milho. A segunda teoria foi recentemente reformulada por Mangelsdorf (1986), que passou a considerar que o milho moderno e as formas anuais de teosintes são derivados do cruzamento inicial de um milho primitivo com um teosinte perene. Tal premissa tem como base a análise de espigas resultantes do cruzamento entre um milho pipoca primitivo, o Palomero Toluqueño, e o teosinte *Zea diploperennis*, quando se obteve em F2 plantas de teosintes com caracteres de anuais. Esses experimentos deram suporte para a nova tese de Mangelsdorf, ou seja, que o milho moderno tem como ancestrais o teosinte e o milho selvagem, sendo o último seu progenitor.

Beadle (1980) apresentou evidências de que a domesticação do

milho teria ocorrido ao longo de um período de alguns milênios sob a ação da seleção artificial. Numa primeira etapa, cruzamentos entre teosinte e uma espécie de milho primitivo teriam produzido um teosinte modificado, ainda bastante semelhante à essa gramínea selvagem. A seguir, uma mutação simples teria originado uma variedade de teosinte tunicado, no qual a cúpula forte que reveste os frutos teria sido convertida em glumas macias, o que facilitaria a debulha. Novas mutações teriam levado à exposição dos grãos, ao aumento do número de fileiras de grãos, chegando-se por fim ao milho adaptado à produção de grãos, agora incapaz de sobreviver em condições naturais.

Duas teorias foram apresentadas na tentativa de esclarecer como o milho surgiu do teosinte. Uma defendida por Galinat (1971, 1975, 1983), sugere que a domesticação do milho ocorreu em duas etapas: uma primeira com a seleção inconsciente do homem sobre o teosinte, e uma segunda quando foi aplicada a seleção consciente sobre o teosinte após a incorporação de várias mutações simples que alteraram substancialmente a estrutura de sua espiga facilitando, desse modo, a domesticação. A segunda teoria, apresentada por Iltis (Allen & Iltis, 1980; Iltis, 1983a, 1983b, 1986; Gould, 1984), chamada de Teoria da Transmutação Sexual Catastrófica (TTSC), diz que a espiga do milho surgiu da feminização da ráquis da panícula terminal dos ramos laterais do teosinte durante um período de tempo relativamente curto.

A idéia de Galinat, afinada com as de De Wet (1975), citado por Iltis (1986) e Harlan (1975) sobre a domesticação do trigo e cevada no Oriente Médio, é de que em regiões independentes do México,

o homem teria feito seleção inconsciente em teosintes, semeando os frutos soltos que ficavam retidos na folha que envolve as espigas. Isso teria resultado na formação de uma bráctea (palha) simples, mais dura, com a função adaptativa de proteger as espigas. Em consequência dessa seleção automática, as plantas teriam passado a concentrar suas espigas em fascículos ou agregados de espigas, cujas palhas acabaram retendo ainda mais os frutos soltos. Essas mudanças adaptativas impediriam que as sementes fossem dispersas naturalmente, aguardando condições mais favoráveis da primavera para o plantio. O segundo passo foi a seleção para caracteres-chaves das espigas, transformando-as de dísticas em polísticas (Galinat, 1983). Essa modificação teria surgido em função da reativação da segunda espiguetas feminina, que é abortada em teosinte, duplicando assim o número de frutos na espiga do tipo selvagem. Deve-se acrescentar que o pareamento das espiguetas masculinas já ocorre em panículas do teosinte. Em seguida, teria havido o aumento de duas para quatro fileiras de grãos, o que produziria uma segunda duplicação do número de sementes. Essa nova estrutura impediria a fragmentação da espiga após a maturação. A ativação da segunda espiguetas teria exercido um papel-chave, porque não só duplicaria o número de frutos, mas também abriria a espiguetas feminina, facilitando a debulha. Segundo Galinat (1988), o gene *pd* é responsável pela espiga simples do teosinte. Um outro gene *tr* produziria duas fileiras de grãos e os  $mr_1$ ,  $mr_2$  e  $mr_3$  aumentariam esse número para maior ordem ainda. A concentração desses genes numa população, por seleção artificial, suprimiria as espigas imediatamente inferiores à espiga mais próxima da panícula terminal, criando um

gradiente de controle conhecido como dominância apical. Em resumo, na teoria de Galinat, o homem teria efetuado seleção inconsciente numa primeira fase, seguida de seleção consciente em teosintes portadores de mutações chaves nas espigas, consolidando assim o processo de domesticação.

A teoria de Iltis, por outro lado, diz que num intervalo de tempo relativamente curto, talvez uma década, houve um processo de compactação dos ramos laterais do teosinte, bem como a feminização das espiguetas da ráquis das panículas terminais (inflorescência masculina) dos ramos laterais, transformando-as em espigas. Essa compactação teria ocorrido também nas espigas recém-formadas, o que traria como consequência um aumento do número de fileiras de grãos. Esse processo poderia ter ocorrido tanto em função da plasticidade fenotípica do teosinte, como também de mutações, que teriam causado o encurtamento dos nós dos ramos laterais. No primeiro caso, enfatizado por Iltis (1986), as plantas de teosinte teriam as espiguetas masculinas feminizadas e as panículas terminais dos ramos laterais transformadas em espigas polísticas, gerando um protomilho, em decorrência de mudanças drásticas nas condições ambientais, que teriam sido causadas por erupções vulcânicas, ou por queda da temperatura, ou por infecção de fungos. Essa rápida mudança foi denominada por Iltis de Transmutação Sexual Catastrófica (TSC), a qual passaria a chamar a atenção do homem para a aplicação de uma seleção consciente direcionada, por um período longo de tempo, que resultaria na domesticação do milho. Nessa fase a seleção para características poligênicas, que condicionam maior compactação do pedúnculo, maior

número de fileiras de grãos, tamanho da espiga e aparecimento da dominância apical, consolidariam a domesticação.

Em resumo, as diferenças fundamentais nas duas teorias se referem à origem da espiga do cultígen. Galinat defende a idéia de que a espiga do milho é proveniente da espiga do teosinte, enquanto Iltis diz que a espiga do milho é originária da inflorescência masculina terminal dos ramos laterais do teosinte.

Embora os dois autores concordem com a existência de vários locais de domesticação, como sugeriram Randolph (1959), McClintock (1959), citados por Galinat (1988) e Mangelsdorf (1974), Galinat (1988) indicam as regiões de Chalco, com 2300 m de altitude e Oaxaca no México, como locais prováveis de domesticação. Iltis (1986), por sua vez, sugere para tal, a localidade de Balsas e possivelmente uma região de Guerrero, também no México, com variações de altitude entre 600 a 1600 m, ambas em encostas ou vales férteis, ricos em calcário, que seriam propícias à prática da agricultura, mesmo em seu estágio primitivo.

#### 2.4. TAXA DE CRUZAMENTO.

A reprodução sexuada nos vegetais superiores envolve a união de dois gametas, o núcleo espermático do grão de pólen e o núcleo reprodutivo do saco embrionário.

Conforme o sistema de reprodução sexual, as plantas podem ser enquadradas em três categorias principais. Plantas autógamas com elevada taxa de autofecundação, conseqüentemente originando progênes com alta frequência de indivíduos homozigotos. Plantas alógamas, quando ocorre um predomínio de cruzamentos naturais, o que obviamente leva à formação de progênes com alta heterozigosidade. E finalmente uma categoria intermediária, quando ocorre simultaneamente uma mistura significativa de autofecundações e cruzamentos (Frankel & Galun, 1977). Logicamente são arbitrários os limites entre uma categoria e outra. Muitos dos sistemas de reprodução obedecem ao padrão intermediário, com um balanço entre a taxa de autofecundação e a taxa de cruzamento, sendo que a proporção relativa de cada uma irá determinar o tipo de estrutura genética dessas populações. Outros processos importantes também são influenciados pela estratégia reprodutiva, como a distribuição da variação genética entre e dentro das progênes das plantas nas populações, o que obviamente tem implicações imediatas na maneira como essa variação é submetida à seleção.

Mesmo estando a taxa de cruzamento sob forte controle genético, a estratégia reprodutiva de muitas espécies é

caracteristicamente plástica e sujeita a influências ambientais, como foi reportado por Hamrick & Allard (1972) e Hamrick (1982). Como fatores que podem levar a alterações do sistema de reprodução, pode-se citar a disponibilidade e comportamento dos agentes polinizadores, a densidade de plantas por área, ou até mesmo a mudança de habitat de uma espécie (Clegg, 1980).

Os métodos tradicionais de avaliação de sistemas reprodutivos em plantas compreendem a análise da morfologia floral, com cruzamentos controlados e observações do comportamento do agente polinizador. A partir da década de 50, entretanto, os geneticistas de plantas passaram a utilizar marcadores genéticos e modelos estatísticos para pesquisar esse aspecto da biologia de populações, estimulados principalmente pelos avanços da técnica de eletroforese de proteínas e pelos modelos estatísticos melhor elaborados, que propiciam uma descrição detalhada do fluxo gênico (Clegg, 1980).

Para estimar a taxa de cruzamento, Nei & Siakudo (1958) propuseram um método baseado nas diferenças entre as frequências genotípicas observadas numa dada população e aquelas esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Com isso estima-se o coeficiente de endogamia ( $F$ ) através das expressões de Wright, e consequentemente a taxa de cruzamento ( $\lambda$ ).

A estimativa da taxa de cruzamento pode ser feita com base em frequências genotípicas obtidas com o uso de marcadores genéticos, quer bioquímicos, quer morfológicos, lançando-se mão de experimentos de campo envolvendo populações isoladas, bem como progênies de indivíduos dominantes, progênies de indivíduos recessivos, progênies

de heterozigotos e progênies de recessivos e heterozigotos (Frankel & Galun, 1977).

Uma abordagem mais recente em milho tem sido o uso de marcadores isoenzimáticos, que apenas dependem da ocorrência de sistemas polimórficos para revelar a frequência variada dos genótipos existentes dentro das populações. O método explora o fenômeno da codominância, que permite uma correspondência unívoca entre o genótipo e o fenótipo (Brown & Allard, 1970; Shaw & Allard, 1982; Sun & Ganders, 1990).

Até o momento não se tem referências de estudos estimando a taxa de cruzamento em teosintes. Em milho, já se tem informação a esse respeito. No estudo mais recente, Kahler et al. (1984), utilizando polimorfismos isoenzimáticos de oito locos gênicos, estimaram uma taxa de cruzamento ao redor de 90%, em duas populações de milho do "Cornbelt", selecionadas para alta produtividade de grãos.

Os resultados obtidos por Fridman (1987), mostrando a considerável influência do fotoperíodo no isolamento temporal de populações de teosintes e milho, através de alterações na época de florescimento, estimulou-nos a estudar como essas respostas acham-se associadas a mudanças nos sistemas reprodutivos dessas gramíneas.

## 2.5. EFEITOS DO FOTOPERÍODO E TEMPERATURA EM MILHO E TEOSINTE.

A hipótese de que o milho descende diretamente dos teosintes é bem aceita atualmente (Beadle, 1980; Iltis, 1983a, 1983b, 1986). Estudos com o provável ancestral, indicam que o teosinte apresenta maior sensibilidade ao fotoperíodo que o milho (Wilkes, 1967; Beadle, 1980; Fridman, 1987).

Fridman (1987) estudando a fotossensibilidade de vários taxa da tribo Andropogoneae, pode concluir que os representantes da Seção Zea, *Zea mays mays* e os teosintes anuais mexicanos, *Z. mays mexicana*, têm respostas mais semelhantes ao comprimento do dia. Por sua vez, os componentes da Seção Luxuriantes, *Z. luxurians* e *Z. diploperennis* diferiram dos primeiros, sendo mais sensíveis ao fotoperíodo. Esse comportamento distinto nas duas categorias pode ser atribuído a frequências gênicas distintas para a indução do florescimento. A domesticação, por seu turno, teria tornado o germoplasma cultivado mais precoce e insensível ao fotoperíodo. Isso decorre do interesse do homem em reduzir a variabilidade de respostas das plantas dentro de suas culturas, visando o aumento da uniformidade como componente importante para se conseguir maior produtividade.

As modificações morfológicas de alguns representantes de Zea, em consequência de mudanças no comprimento do dia, dão uma excelente oportunidade para se estudar alguns aspectos da norma de reação no gênero. Enquanto os teosintes anuais, sob regime de dias longos, perfilham em abundância nos Estados Unidos, eles o fazem

raramente quando crescem em dias mais curtos no México e Guatemala, seus locais de origem. O milho, por sua vez, parece crescer com a mesma morfologia em qualquer lugar, embora revele diferenças na estatura das plantas quando submetido a variações no comprimento do dia, o que parece demonstrar que a resposta ao regime de luz é controlada por frequências genotípicas que podem ser modificadas pela seleção, dando oportunidade para ocorrer a evolução de caracteres adaptativos (Iltis, 1986).

O germoplasma cultivado, *Z. mays mays* L., de origem tropical, apresenta nas várias regiões onde é adaptado um claro padrão de resposta ao fotoperíodo. Assim sendo, os melhoristas, em clima temperado, enfrentam problemas ao trabalhar com germoplasma adaptado às regiões tropicais, uma vez que esse necessita de um comprimento de dia mais curto para que possa florescer e completar o ciclo antes de ser eliminado pelo frio. Consequentemente a fotossensibilidade em milho traz algumas dificuldades para programas de melhoramento, que utilizam materiais de diferentes latitudes, por afetar características importantes, como a altura das plantas, tempo de florescimento e produtividade (Francis, 1970, citado por Rood & Major, 1980; Spencer, 1975). Efeitos semelhantes ocorrem quando se transfere tipos adaptados a fotoperíodo longo para regiões de dias mais curtos. As plantas ficam mais precoces e com baixa estatura, o que concorre diretamente para a redução da sua produtividade.

As respostas das plantas ao comprimento do dia dependem da ação de genes que controlam a indução do florescimento. Langham (1940) estudando híbridos de milho, adaptados ao plantio no "Cornbelt", e

teosinte, *Z. mays mexicana* e populações segregantes, relatou a existência de um padrão de herança mendeliana para a resposta ao fotoperíodo, já prevendo ser essa uma importante característica a ser investigada no esclarecimento da origem do tipo cultivado a partir do selvagem. Através da análise dos cruzamentos feitos por esse autor, foi possível concluir que a insensibilidade do milho ao regime de luz é dominante sobre o caráter de forte sensibilidade demonstrada pelo teosinte.

Por sua vez, Rogers (1950) pesquisando a herança da resposta de milho ao regime de luz em populações segregantes de híbridos de milho de região temperada e teosinte, pode concluir que de maneira geral a resposta ao fotoperíodo estava relacionada com a origem geográfica das variedades testadas, sendo condicionada por vários genes encontrados principalmente nos cromossomos 8 e 10 desses dois taxa.

Mais recentemente, Russel & Stuber (1983b) analisaram progênies de retrocruzamentos e postularam a existência de uma ação gênica aditiva para a herança da fotossensibilidade em milho, estudando as progênies dos cruzamentos de uma linhagem e um híbrido da região temperada. Esses mesmos autores, investigando diferentes linhagens de milho temperado e a cultivar "Gaspé Flint", adaptada à alta latitude, em estudos da resposta de milho ao fotoperíodo, examinaram o efeito da interação fotoperíodo x temperatura, comparando-o em dois critérios de medida da maturação: dias para iniciação da panícula e número total de folhas. Em suas condições de estudo, puderam concluir que o efeito do tratamento de luz era bem

maior que o da temperatura, e que o número total de folhas é um critério mais adequado para prever a duração do período de desenvolvimento vegetativo. Conseqüentemente, o número de folhas foi sugerido para avaliar a influência do comprimento do dia, pois demonstrou ser mais estável e menos sensível à temperatura, além de ser facilmente avaliado sem qualquer dano às plantas (Russel & Stuber, 1983a).

Considerando ainda os tipos de respostas que podem ser analisadas na avaliação dos efeitos do fotoperíodo, alguns cultivares de milho de clima temperado quando submetidos a dias longos durante o desenvolvimento vegetativo, podem apresentar um significativo aumento de seus ciclos. Isso foi notado por Garner & Allard (1923) em citação de Russel & Stuber (1983a).

Anteriormente, Allison & Daynard (1979) mostraram que o período entre a semeadura de duas variedades comerciais de milho de clima temperado e o início da formação das inflorescências femininas foi encurtado em condições de dias curtos, em experimentos controlados em câmaras de crescimento. Detectaram, como consequência, uma diminuição da área foliar das plantas, devido ao menor número de folhas formadas.

Wilkes (1967) realizou o estudo mais aprofundado de biologia da reprodução de teosintes, acompanhando suas fases de crescimento e desenvolvimento em populações naturais no México e na Guatemala. Entre outros pontos, relatou a diferença da época de florescimento dos vários teosintes. Os teosintes do México, raças Central Plateau, Nobogame, Chalco e Balsas foram os primeiros a florescer, sendo

seguidas pelas raças da Guatemala, Huehuetenango e Guatemala. Quanto a arquitetura das plantas, notou que quando observadas no habitat natural, apresentavam as ramificações laterais limitadas aos nós superiores. Por sua vez, quando cultivadas em elevadas latitudes passavam a apresentar essas ramificações a partir dos nós inferiores ao longo de todo o colmo. Registrou também em suas observações a forte fotossensibilidade do germoplasma selvagem, em comparação com o milho, taxon domesticado.

Wellhausen et al. (1952) estudaram um grande número de características morfológicas e reprodutivas das principais 25 raças de milho do México. Entre os vários fatores citados, os autores destacaram a altitude como tendo um papel relevante na formação da enorme diversidade genética encontrada no provável centro de origem do milho. A principal componente desse efeito seria a temperatura, pois sabe-se que esse é um fator bastante distinto nas várias faixas de altitude. Dos seus dados pode-se verificar que cerca de 48% das raças de milho do México são adaptadas a regiões ao nível do mar até 1000 m, 32% são provenientes da faixa de 1000 a 2000 m e 20% são de regiões acima de 2000 m de altitude. Essas raças foram cultivadas em Chapingo, México, a 2200 m de altitude, e serviram para a coleta de várias informações. Verificaram que 48% delas foram precoces, com florescimento variando de 90 a 107 dias após o plantio; 26% apresentaram um florescimento médio, variando de 107 a 125 dias; 9% das raças foram tardias, florescendo entre 135 e 137 dias e 13% foram muito tardias, com o período de ântese variando entre 148 a 160 dias após a semeadura. A quase totalidade das raças produziu perfilhos

nessa altitude de 2200 m. Considerando os tipos de ciclo precoce, observaram que a altura das plantas variou de 1,5 a 2,4 m; os de ciclo médio cresceram entre 2,0 e 3,0 m; os tardios de 3,0 a 4,5 m e os bem tardios de 3,5 a 6,0 m, nas condições de Chapingo, mostrando como se tem constatado em milho, de uma maneira geral, que a data de início do florescimento é positivamente correlacionada com a altura das plantas.

Resultados semelhantes foram mostrados por Wellhausen et al. (1958) estudando as 12 principais raças de milho da América Central, com destaque para a Guatemala. A maior parte do milho desse país é produzido em altas altitudes com verão de temperatura média ao redor de 17°C e inverno de aproximadamente 8°C. Esses autores estimaram que a cada 300 m de altitude o ciclo das plantas aumenta de 2 semanas. Com isso, são realizados plantios de Fevereiro a Abril em altitudes que vão de 1500 a 3100 m, e o ciclo das plantas pode, nesse caso, oscilar de 7 a 12 meses. Por outro lado, em terras mais baixas de zero a 1500 m, a temperatura no verão é maior e varia de 23 a 27°C. Dessa maneira, o ciclo das plantas é reduzido de 3 a 6 meses, dando oportunidade para a realização de dois plantios anuais. Um em Março, Abril ou Maio, e outro em Setembro ou Outubro (Tabela 1). As doze principais raças da América Central quando avaliadas em Chapingo, México (2200 m) mostraram que 30% têm ântese precoce, de 80 a 95 dias após o plantio, 26% apresentaram ciclo médio, de 95 a 100 dias para iniciar a ântese e 44% delas têm ciclo mais tardio, de 110 a 125 dias. Isso significa que mais da metade terá ciclo precoce em altitudes mais baixas, implicando numa provável redução do tamanho da planta em consequência da abreviação do ciclo.

Efeitos semelhantes aos do fotoperíodo e da temperatura na natureza podem ser mostrados através de experimentos com o cereal em câmaras de crescimento. Desse modo, Stevenson & Goodman (1972) estudaram o efeito de 4 níveis de temperatura e dois regimes de fotoperíodo no número de folhas e número de perfilhos de 16 raças de milho. O efeito do fotoperíodo, com os tratamentos de 9 horas de luz e 9 horas de luz com o período do escuro interrompido por 3 horas, foi o fator mais importante para alterar o número de folhas, e portanto, o florescimento das plantas. No regime de 9 horas de luz, as plantas foram mais precoces, produzindo também um menor número de folhas. O efeito da temperatura, embora de menor magnitude que o do comprimento do dia, também foi significativo. Temperaturas menores, tornaram as plantas mais tardias, assim como reduziram o número de folhas. O número de perfilhos, ramificações no colo das plantas, foi estimulado com a redução da temperatura, e segundo os autores pode, como em trigo e cevada, estar também associado à intensidade luminosa incidente na cultura. Pois em trigo, Friend (1965) mostrou que condições de temperatura de aproximadamente  $10^{\circ}\text{C}$ , associadas à alta intensidade de luz, promovem a produção de perfilhos. Isso é compatível com a alta quantidade de luz disponível em baixas densidades de plantio, que induz a formação de perfilhos em milho, em ambiente onde a característica se expressa. É conhecido há muito que quanto maior a penetração de luz, maior o número de perfilhos em germoplasma geneticamente capaz de produzi-los.

Em outro trabalho, Bonaparte (1975) investigando o efeito da temperatura e do comprimento do dia em 4 níveis de fertilidade de solo

e umidade variável, em três híbridos adaptados ao "Cornbelt", observou uma interação significativa entre temperatura e fotoperíodo. Em regime de 12 horas de luz e temperaturas de 26/10°C e 26°C, encontrou uma média de emergência da panícula de 69,4 e 38,1 dias após o plantio, respectivamente. Em regime de 16 horas de luz encontrou 56,8 e 46,5 dias, respectivamente, para as temperaturas de 26/10°C e 26°C. Embora tenha ocorrido uma forte interação fotoperíodo x temperatura, o efeito dessa última no escuro foi altamente significativo para atrasar o florescimento, confirmando as informações obtidas por Wellhausen et al. (1952, 1958) em experimentos de campo, envolvendo raças de milho do México e Guatemala.

Em outra abordagem, Allison & Daynard (1979) estudaram o desempenho de dois híbridos de milho, adaptados à alta latitude do "Cornbelt", em dois regimes de luz, 10 e 15 horas, e em dois níveis de temperatura, 20 e 25°C, em câmara de crescimento. No tratamento de 10 horas de luz, em temperatura de 20 e 25°C, as plantas emitiram seus estilo-estigmas em 64,0 e 54,5 dias após o plantio, respectivamente. Por sua vez, nas condições de 15 horas de iluminação, a 20 e 25°C, a média do florescimento ocorreu aos 68,5 e 57 dias após o plantio, respectivamente.

Goldsworthy & Colegrove (1974a) ainda explorando esse aspecto, estudaram o desenvolvimento de cinco variedades de milho tropical adaptados à alta altitude, em experimentos de densidade de plantio em El Batán, México, a 2250 m de altitude. Mostraram que todas as variedades, como era esperado, produziram nessa condição de alta altitude uma considerável quantidade de perfilhos, obtendo numa

densidade de plantio de 50000 plantas/ha, uma frequência média de 4,8 perfilhos por metro quadrado. Paralelamente Goldsworthy et al. (1974b) compararam três variedades adaptadas à baixa altitude (0 a 600 m) da região tropical, em duas altitudes distintas no México, Tlaltizapan (940 m) e Poza Rica (60 m). Essas variedades não produziram perfilhos nessas condições, e emitiram seus estilo-estigmas em época distinta. Em maior altitude, as plantas floresceram em média aos 93 dias após o plantio, e mais ao nível do mar, aos 76 dias. Esse atraso no florescimento foi também atribuído a temperaturas baixas que ocorrem durante a noite nas regiões mais altas. Essas evidências mostram o efeito correspondente do fotoperíodo e da temperatura no florescimento do milho. O efeito de temperaturas menores corresponde ao efeito de fotoperíodos maiores. Da mesma forma que o efeito de temperaturas maiores corresponde ao efeito de fotoperíodos menores.

Tabela 1. Períodos de sementeira, ciclo de vida e colheita de milho plantado em diferentes altitudes na América Central, segundo dados de McBryde (1947), citado por Wellhausen (1958).

Altitude (m)	Sementeira	Ciclo de vida (meses)	Colheita
0 - 100	Maio	3 - 4	Julho/Agosto
	Agosto	3 - 4	Outubro/Novembro
100 - 1350	Março/Abril	4 - 5	Julho/Agosto
	Set/Outubro	5	Fevereiro
	Ano todo*	2 - 3	—
1350 - 1500	Abril	6 - 7	Setembro
1500 - 2250	Abril/Maio	9 - 10	Dez/Janeiro
2250 - 2500	Março	9 - 10	Nov/Dezembro
2500 - 2750	Fevereiro	11 - 12	Jan/Fevereiro
2750 - 3100	Fevereiro	12	Fevereiro

\* Para variedades muito precoces.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS.

Os experimentos foram realizados na Área Experimental do Laboratório de Genética Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (SP), localizada a 22° 54' latitude sul, nos períodos de Fevereiro a Julho de 1989 (fotoperíodo curto) e Outubro de 1989 a Julho de 1990 (fotoperíodo longo), simulando respectivamente condições de baixa e alta altitude, que são características do centro de origem do milho. As informações sobre as temperaturas médias, máxima e mínima, a precipitação pluviométrica e fotoperíodo dos dois períodos são mostradas na Tabela 2.

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DO GERMOPLASMA.

O germoplasma de teosinte estudado procedeu de três coleções distintas: 1) Coleção do Centro Internacional para o Melhoramento do Milho e Trigo - CIMMYT no México); 2) Coleção do Laboratório do prof. Hugh Iltis da Universidade de Wisconsin e 3) Coleção do Dr. Angel Kato do Instituto Nacional de Investigações Agrárias - INIA no México. A população de milho, denominada mazóide I-8 foi desenvolvida no Laboratório de Genética de Milho da UNICAMP.

Os teosintes são gramíneas anuais ou perenes, pertencentes às espécies *Zea mays*, *Z. diploperennis*, *Z. luxurians* e *Z. perennis*, e que estão agrupadas em duas Seções, *Zea* e *Luxuriantes*, segundo as características morfológicas da cúpula que reveste o fruto e das espiguetas das inflorescências masculinas, segundo Doebley & Iltis

(1980). As populações de teosinte e milho cultivadas no presente trabalho foram:

*Zea mays* ssp *mexicana* (Schrader) Iltis, tendo como representantes as raças Central Plateau (CP) e Chalco Los Reyes (LR), que são teosintes anuais do México e apresentam respostas fotoperiódicas semelhantes, sendo dentre os teosintes os mais precoces tanto em dias curtos como em dias longos, sendo muito parecidos com o milho até a época do florescimento, e na sua maioria os frutos são triangulares.

*Zea mays* ssp *parviglumis* var *huehuetenanguensis* Iltis & Doebley (PH), o teosinte anual do Centro-Oeste da Guatemala. Caracterizado principalmente por ser o material mais sensível ao fotoperíodo, sendo o mais tardio a florescer tanto em dias curtos como em dias longos, praticamente duplicando o intervalo de tempo de crescimento vegetativo quando cultivado naquela última condição. Seus frutos são em grande parte trapezoidais e pequenos.

*Zea luxurians* (Durieu & Ascherson) Bird, LX, é um teosinte anual com distribuição natural no Sudeste da Guatemala e Honduras. Apresenta grande uniformidade dentro da população, com alto grau de perfilhamento e produção de massa vegetativa, o que é mais evidente sob cultivo em dias longos, quando alguns dos seus indivíduos podem atingir alturas de pouco mais de 5 m. Seus frutos são predominantemente trapezoidais.

*Zea diploperennis* Iltis, Doebley & Guzmán, DP, é uma espécie perene, primeiramente descoberta por Hitchcock (1910), presumidamente extinta em estado selvagem desde 1921 e recentemente redescoberta por

Guzmán (1979). Sua distribuição é restrita à região de Jalisco (México). Possui resposta fotoperiódica semelhante à espécie *Z. luxurians*, produzindo uma grande quantidade de massa vegetativa quando cultivada em dias longos. Trata-se de uma população também uniforme, com frutos em grande parte trapezoidais. Sua redescoberta pode fornecer pistas à investigação da evolução do gênero *Zea*, e ainda esclarecer a origem da espécie tetraplóide *Z. perennis* (Iltis et al., 1979). Oferece ainda amplas possibilidades de transferência, para o milho, de genes que confirmam resistência a patógenos, e quem sabe até a obtenção do milho perene.

A população de milho mazóide I-8, representante de *Zea mays* ssp *mays* L., M, tem endosperma do tipo dentado, e é resultante do cruzamento de milho Maya com teosinte Chalco Los Reyes. Após a 6ª geração, deu-se início à seleção para aumento do número de fileiras de grãos, e somente espigas com número de fileiras superior a oito eram recombinadas em lotes isolados de polinização aberta. Ao final do quarto ciclo de seleção, passou-se a selecionar espigas dentadas, cujos grãos produzem as plantas que têm sido recombinadas nos últimos anos.

Tabela 2. Máxima e mínima da temperatura média, precipitação e fotoperíodo durante os meses que as plantas vegetaram para avaliação das populações de Zea em regime de dias longos e curtos, na Área Experimental da UNICAMP, Campinas - SP.

Regime	Meses	Temp. média (°C)		Precipitação (mm)	Fotoperíodo (horas/dia)
		Máx.	Mín.		
Dias longos	Out 89	27.4	16.3	28.4	12.42
	Nov 89	25.6	19.2	222.0	13.06
	Dez 89	26.2	16.8	158.5	13.24
	Jan 90	28.2	19.3	373.6	13.12
	Fev 90	28.0	21.8	122.2	12.48
	Mar 90	27.4	22.2	205.2	12.04
	Abr 90	27.4	18.5	49.5	11.23
	Mai 90	23.1	11.8	58.4	10.51
	Jun 90	21.9	12.2	9.4	10.36
Jul 90	20.5	10.1	122.7	10.48	
Dias curtos	Fev 89	27.3	19.8	178.8	12.48
	Mar 89	27.7	22.3	96.3	12.04
	Abr 89	25.7	19.7	37.6	11.23
	Mai 89	25.9	13.6	17.6	10.51
	Jun 89	22.1	13.8	48.4	10.36
	Jul 89	21.6	12.4	111.2	10.48

Dados fornecidos pelo CEPAGRI (Centro de Ensino e Pesquisa em Agricultura - UNICAMP).

### 3.2. CONDUÇÃO DOS LOTES EXPERIMENTAIS.

Cada uma das seis populações foi cultivada em lotes isolados em solo uniforme em estrutura e fertilidade. Os lotes foram padronizados em 14 linhas de 20 m de comprimento, espaçadas de 1 m, semeando-se 3 a 5 sementes por cova, com distanciamento de 20 cm dentro da linha. Após o crescimento inicial das plantas, ao redor de um mês, efetuou-se o desbaste, deixando-se uma planta por cova. Cuidados culturais foram tomados como a aplicação de fertilizante na base de 80 Kg de N, 80 Kg de  $P_2O_5$  e 80 Kg de  $K_2O$  por hectare, sendo também realizadas capinas manuais periódicas para eliminar a competição de ervas daninhas.

### 3.3. DADOS COLETADOS.

Um conjunto de observações foi efetuado para que se pudesse estudar a influência do fotoperíodo na época e amplitude do florescimento, bem como nas características da arquitetura das plantas, que pudessem alterar as estratégias reprodutivas das populações estudadas. Esses dados foram coletados em duas condições de fotoperíodo distintas: dias curtos e dias longos.

#### 3.3.1. FENOLOGIA REPRODUTIVA.

Pouco antes do florescimento, cerca de 110 plantas, em média, de cada população foram amostradas ao acaso e marcadas com etiquetas, onde foram anotadas as datas de eventos para a análise de fenologia reprodutiva. Essas datas foram:

-Início e fim da ântese nas panículas terminais (PTI e PTF).

-Início e fim da ântese nas panículas dos ramos laterais, PRI e PRF, obviamente apenas nas populações de teosintes, uma vez que o milho não apresenta ramificações laterais em nossa altitude.

-Início e fim da saída dos estilo-estigmas (SEI e SEF).

Durante o período do florescimento, procedeu-se o acompanhamento diário de cada uma das populações, para a coleta dos dados mencionados.

### 3.3.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS POPULAÇÕES.

Além da amostra citada no item 3.3.1., para a tomada de dados sobre o florescimento, tomou-se uma segunda amostra, também ao acaso, constituída de 20 plantas que serviram à coleta de informações de outras características que são enumeradas a seguir:

-Número de espiguetas em 5 cm da porção mediana da ráquis da panícula terminal (NEG).

-Comprimento (mm) das espiguetas da porção inferior, média e superior dos 5 cm médios da ráquis da panícula terminal (CEI, CEM, CES).

-Número de nós do colmo principal (NND).

-Número de perfilhos (NP).

-Número de infrutescências (NI).

-Peso seco da parte aérea do colmo principal e perfilhos (PSPA).

-Peso dos frutos produzidos pelo colmo principal e perfilhos (PF).

-Altura do colmo principal em centímetros (ALT).

-Comprimento e largura da folha média do colmo principal em centímetros (CF e LF).

-Dominância Apical (DA). Para essa variável tomou-se datas da saída de estilo-estigmas em espigas dos ramos dos teosintes, e da saída de estilo-estigmas das espigas do milho, para se detectar a existência ou não de um gradiente de florescimento das espigas a partir da inflorescência masculina terminal, induzido logo após o florescimento dessa última. A ordem de florescimento das espigas foi anotado. A dominância apical ficou caracterizada quando o florescimento ocorria num gradiente a partir da panícula terminal, e nesse caso recebia o valor codificado 1 (um). A ausência de dominância apical ficou caracterizada pelo florescimento desordenado, ou seja, ao acaso, atribuindo-se o valor codificado 0 (zero).

As medidas de altura, número de perfilhos, número de nós, número de espigas, comprimento e largura da folha média foram tomadas na fase final de maturação das plantas.

Para a contagem de espiguetas e medida do comprimento das mesmas, coletou-se a ráquis da panícula terminal. Essas amostras foram levadas ao laboratório, onde foi feita a contagem e medida do comprimento com o auxílio de um paquímetro.

Para a tomada de peso seco da parte aérea, as plantas foram coletadas individualmente, cortadas em pedaços ainda no campo, e acondicionadas em sacos de papel. No laboratório foram secas em estufa de circulação forçada de ar a uma temperatura de  $68 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , até que fosse atingido peso constante. Em seguida, procedia-se à pesagem.

A pesagem dos frutos foi feita após a separação dos mesmos da palha das espigas, e no caso do milho após a retirada dos mesmos das ráquis de sustentação (sabugos). Foram então submetidos à secagem para retirada do excesso de umidade, e pesados em seguida.

Esse conjunto de informações foi obtido no período entre a maturação das plantas e o início da fase de senescência, pois a coleta dos frutos dos teosintes não pode esperar o completo amadurecimento dos mesmos, devido ao fato das suas espigas serem fragmentáveis. Com isso poderia ocorrer a mistura e perda dos frutos no solo.

As medidas das variáveis do florescimento e variáveis morfológicas foram submetidas à análise canônica. Quanto as últimas também foram obtidas suas médias e erros padrões das médias, considerando-se as amostras de 20 plantas de cada população estudada. As distâncias de Mahalanobis foram estimadas com base em todas as características observadas.

### 3.4. ESTIMATIVA DE TAXA DE CRUZAMENTO.

Para se estimar a taxa de cruzamento das populações estudadas, fez-se uma mistura constituída de igual número de frutos escolhidos ao acaso de cada indivíduo em cada uma das populações. Para o plantio de dias curtos, coletaram-se 20 frutos por planta de 50 indivíduos, dentro das populações. Já no plantio de dias longos, foram coletados 30 frutos por planta em amostras de 50 indivíduos.

A taxa de cruzamento foi estimada segundo o método de Nei & Siakudo (1958), baseado nos resultados das variantes eletroforéticas,

dentro dos sistemas em que foi possível observar polimorfismo e estimar as frequências genotípicas de homozigotos e heterozigotos de cada população. Com isso determinou-se a taxa de endogamia (F), usando-se as expressões de equilíbrio de Wright e conseqüentemente a taxa de cruzamento natural ( $\lambda$ ) segundo a equação:

$$\lambda = \frac{1 - F}{1 + F}$$

#### 3.4.1. METODOLOGIA DE ELETROFORESE.

O protocolo usado foi baseado na metodologia sugerida por Stuber et al (1988), com algumas modificações.

##### -PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.

As sementes, desinfectadas com Hipoclorito de Sódio comercial 50% foram colocadas para germinar em placas de Petri esterilizadas, contendo papel de filtro úmido também estéril, e deixadas no escuro à temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante um período de cinco dias. Como foi verificada uma baixa porcentagem de germinação nas amostras colhidas do plantio de dias longos, procedeu-se à retirada das cúpulas dos frutos, tratamento que foi bastante eficaz na quebra de dormência, conforme a experimentação que está descrita no tópico 3.5.

Coleóptilos de 1 a 4 cm de comprimento foram utilizados para a obtenção de um macerado, usando-se como extrator Sacarose (16.7%) e Ácido Ascórbico (8.3%), em placas de acrílico resfriadas com gelo. Imediatamente os extratos eram absorvidos em papel de filtro Watmann de 2 mm e mantidos protegidos do dessecamento dentro da geladeira até sua aplicação nos géis.

#### -PREPARO DO GEL.

O suporte utilizado para a corrida das amostras foi gel de amido de batata hidrolizado (110.5 g/l) da SIGMA, cujo tampão era 2.5% de Tris 0.0152 M e 2.5% de Citrato 0.036 M pH 8.30. O tampão do eletrodo utilizado foi uma solução de Ácido Bórico 0.3 M pH 8.30. Essa etapa era cumprida um dia antes de cada corrida, seguindo os seguintes passos:

-Dissolução de todo o amido em 1/4 da solução do gel a 10°C. Os 3/4 restantes do tampão eram submetidos à fervura.

-Obtenção de uma emulsão, com a mistura da suspensão homogênea do amido com o restante do tampão sob fervura, e retirada do ar com o auxílio de uma bomba a vácuo.

-Preenchimento das placas moldes com o gel ainda quente, nivelando-as com placas de vidro, aplicando-se uma leve pressão.

-Manutenção dos géis à temperatura ambiente por cerca de 15 horas e resfriamento dos mesmos em câmara frigorífica por 20 minutos antes da aplicação das amostras.

#### -ELETROFORESE.

Aplicava-se inicialmente um potencial de 25 mA durante um intervalo de 30 minutos para que se iniciasse a corrida. Em seguida,

retirava-se os papéis e aumentava-se gradualmente o potencial para 30 mA até que se atingisse 300 V, resultando num tempo de corrida de três e meia a quatro horas. Após esse tempo, o gel era cortado em 5 camadas horizontais e revelado para os sistemas que demonstrassem polimorfismos em cada uma das populações estudadas, e que permitissem a estimativa das taxas de cruzamento. Tais sistemas foram:

-Glutamato Oxaloacético Transaminase - GOT - para o qual se utilizou os reagentes: alfa-KG 100 mg, Ácido Aspártico 200 mg, Tris (0.1 M) 100 ml, PSPP 10 mg e Fast Blue BB 150 mg.

-Álcool Desidrogenase - ADH - utilizando-se:  $\text{NAD}^+$  20 mg, MTT 10 mg, PMS 2 mg, Tris (0.1 M pH 7.5) 50 ml e ETOH (99%) 3 ml.

Os outros sistemas testados foram: enzima málica (ME), fosfoglucomutase (PGMD), peroxidase (PRX), esterase (EST), e glutamato desidrogenase (GDH). Entretanto tiveram que ser excluídos por não demonstrarem boa resolução.

### 3.5. EXPERIMENTO DE GERMINAÇÃO.

Essa etapa foi feita com duplo objetivo. Primeiro para se avaliar o efeito de dormência em teosintes. Segundo, desenvolver uma técnica para reduzir esse efeito na germinação, e permitir assim um rápido preparo do material para as análises eletroforéticas logo após a colheita dos frutos. Portanto, procedeu-se inicialmente a montagem de um experimento, onde se submeteu o germoplasma *Zea mays mexicana* (Craças Central Plateau e Chalco Los Reyes), *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*, *Z. diploperennis* e *Z. luxurians* a quatro tipos de

tratamento com quatro repetições, em parcelas experimentais de 100 frutos, que haviam sido colhidos há dois meses em média, seguindo o delineamento Inteiramente Casualizado. Os tratamentos foram os seguintes:

- 1-Frutos com cúpula sem lavagem em água corrente.
- 2-Frutos com cúpula lavados em água corrente por 6 horas.
- 3-Frutos sem cúpula sem lavagem em água corrente.
- 4-Frutos sem cúpula lavados em água corrente por 6 horas.

Os frutos dos tratamentos sem cúpula foram descascados com o auxílio de um alicate cortante, tendo-se o cuidado de não provocar lesões nos embriões e no endosperma. Para os tratamentos em água corrente, os frutos foram acondicionados em vidros de boca larga vedados com meia de nylon e submetidos a água corrente durante 6 horas, dentro de uma caixa plástica com orifícios que permitiam um fluxo constante de água para lavagem e oxigenação da mesma.

A esterilização dos frutos foi feita de duas maneiras em função da proteção das sementes: uma com Hipoclorito de Sódio comercial 20% durante 5 minutos, sob agitação manual para os frutos sem cúpula e outra com Hipoclorito de Sódio comercial 50% durante 10 minutos sob agitação manual para os frutos com cúpula. Após a desinfecção, os frutos, lavados com água destilada autoclavada, foram colocados para germinar em placas de Petri contendo papel de filtro úmido e estéril. As placas foram mantidas em câmara de cultivo à temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por um período de 7 dias. Ao final desse prazo, contava-se o número de plântulas normais germinadas, obtidas em cada tratamento.

Um segundo experimento foi feito oito meses mais tarde para verificar se o efeito de dormência ainda estava presente nos mesmos lotes de frutos que foram submetidos ao primeiro teste de germinação. Nesse último foram analisados apenas os tratamentos que se mostraram significativos no experimento anterior, ou seja, frutos com e sem cúpula, sem lavagem em água corrente.

Os dados resultantes desses experimentos foram submetidos a uma análise de variância e ao teste de comparação de médias de Tukey.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DO GERMOPLASMA.

#### 4.1.1. ANÁLISE DO PADRÃO DE FLORESCIMENTO.

Pouca atenção tem sido dada aos estudos dos efeitos da variação do comprimento do dia ou da temperatura sobre o desenvolvimento de plantas de espécies selvagens em comparação com seus parentes domesticados. A primeira iniciativa nesse sentido em *Zea* foi feita por Fridman (1987), demonstrando que o milho e os teosintes apresentam respostas diferentes às mudanças de regime de luz, sendo o tipo cultivado mais insensível, enquanto seus parentes selvagens são bem mais sensíveis às mudanças do comprimento do dia, possuindo dentro deles fotossensibilidade variável. Naquele trabalho ficou também evidente a existência de características morfológicas e fisiológicas comuns dentro dos grupos de teosintes, associadas às duas respostas específicas ao fotoperíodo. O fato de ter sido demonstrado por Fridman (1987) que essa característica é importante para determinar o isolamento reprodutivo dos parentes selvagens do milho, estimulou-nos a investigar aspectos relacionados à resposta das plantas ao comprimento do dia que pudessem ajudar na elucidação do processo de domesticação do milho. Outro ponto importante para o estudo da evolução dentro do gênero *Zea*, é que as respostas das plantas a mudanças do fotoperíodo são correspondentes às respostas a mudanças de

altitude, determinadas pela temperatura.

As estimativas de parâmetros do florescimento são mostradas na Tabela 3. Com relação à ântese nas panículas terminais (PT), os dados revelam que quatro teosintes foram iguais ou mais precoces que a população do milho em dias curtos, enquanto a variedade *huehuetenanguensis* foi significativamente mais tardia que qualquer população. Sob dias longos, todos os taxa selvagens foram mais tardios que o milho, indicando uma expressiva interação populações x resposta ao fotoperíodo, sugerindo que o germoplasma estudado possui conjuntos gênicos diferentes para a resposta ao comprimento do dia. A interação populações x resposta ao fotoperíodo surge em decorrência de um fato muito claro. Em dias longos, as diferenças no florescimento dos teosintes e do milho ficam muito grandes, variando de 41 a 135 dias, enquanto em dias curtos os teosintes ficam bem mais precoces e essas diferenças são drasticamente reduzidas. Nessas condições alguns teosintes ficam até 17 dias mais precoces que o tipo domesticado, e apenas *huehuetenanguensis* fica distanciado, sendo 35 dias mais tardio que o milho. Esses dados são importantes e revelam que todos os teosintes, com exceção do *huehuetenanguensis*, em dias curtos passam a ter ciclo bem próximo do tipo domesticado.

A precocidade, bem como a menor sensibilidade ao fotoperíodo, expressas pelo taxon cultivado são atributos facilmente encontrados também em outras espécies domesticadas. Tais caracteres têm sido sugeridos como consequência do processo de seleção artificial para tornar as plantas mais adequadas para atender o interesse do homem (Harlan et al., 1973; Zeven & de Wet, 1982; Ashri, 1989).

A ântese nas panículas dos ramos (PR) mostrou o mesmo tipo de distribuição apresentado pela ântese na panícula terminal, porém defasada em alguns dias, o que serve para assegurar um período maior de disponibilidade de pólen. O milho por não apresentar ramos laterais, concentra bem mais seu período de produção de pólen.

Com relação à saída de estigmas (SE), nota-se que em dias curtos ocorre uma diferença entre a saída dos estigmas e a ântese (SEI-PTI) de 2,8 dias em média para os teosintes, enquanto no milho houve uma diferença menor, de um dia apenas. Em dias longos, por sua vez, essa mesma diferença foi de 2 dias no tipo domesticado, enquanto nos teosintes foi de 7,4 dias, em média, mostrando a existência de interação genótipo x comprimento do dia para a diferença no florescimento das duas inflorescências.

Tabela 3. Início (I) e fim (F) do período de ântese das flores estaminadas da panícula terminal (PT) e dos ramos laterais (PR), início (I) e fim (F) da saída dos estigmas das flores pistiladas (SE), período de pólen disponível (PPD) e período de estigmas receptivos (PER) de populações de teosintes e milho (POP) cultivadas sob fotoperíodo curto (c) e longo (l). Os números se referem a dias após o plantio.

Pop	Número de plantas	PT		PR		SE		PPD	PER	
		I	F	I	F	I	F			
CP	c	131	49	79	54	98	46	81	49-88	46-81
	l	106	115	150	131	167	133	163	115-167	133-163
LR	c	85	52	86	61	87	52	97	52-87	52-97
	l	97	112	154	127	164	129	164	112-164	129-164
DP	c	119	51	104	56	107	52	105	51-107	52-105
	l	103	162	179	169	190	163	188	162-190	163-188
LX	c	90	61	110	69	119	55	114	61-119	55-114
	l	106	170	181	176	194	170	182	170-194	170-182
PH	c	112	101	144	116	161	106	145	101-161	55-114
	l	93	206	240	217	247	205	241	206-247	205-241
M	c	130	66	86	-	-	67	100	66-86	67-100
	l	151	71	88	-	-	73	95	71-88	73-95

CP - *Z. mays mexicana* (Central Plateau).

LR - *Z. mays mexicana* (Chalco Los Reyes).

DP - *Z. diploperennis*.

LX - *Z. luxurians*.

PH - *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*.

M - *Z. mays mays*.

Considerando as diferenças entre dias longos e dias curtos (l-c) para as variáveis início da ântese nas panículas terminais, ântese nas panículas dos ramos laterais e extrusão dos estilo-estigmas, obtém-se indicações das respostas das seis populações à alteração no regime de luz. Essas diferenças podem ser facilmente calculadas com os dados da Tabela 3. Para as populações CP, LR, DP, LX, PH e M as diferenças (l-c) para o início da ântese nas panículas terminais foram de 66, 60, 111, 109, 105 e 5, respectivamente, e de 77, 66, 113, 107 e 101 para o início da ântese nas panículas dos ramos laterais, respectivamente para CP, LR, DP, LX e PH. Essas diferenças para a saída de estilo-estigmas foram de 6, 99, 115, 111, 77 e 87 respectivamente para M, CP, LR, DP, LX e PH. Essas diferenças indicam claramente que o milho responde ao fotoperíodo de maneira muito distinta dos tipos selvagens. O tipo domesticado é muito pouco sensível às variações do comprimento do dia, enquanto os teosintes variam significativamente em grupos distintos. Assim CP e LR apresentaram comportamento semelhante, revelando sensibilidade acentuada, porém intermediária entre o milho e os tipos de sensibilidade extrema, pertencentes à Seção Luxuriantes, DP e LX. A variedade *huehuetenanguensis*, por seu turno, embora colocada na Seção Zea por Doebley & Iltis (1980), apresentou, nesse aspecto, resposta bem mais próxima aos componentes da Seção Luxuriantes. Essas observações confirmam aquelas obtidas anteriormente por Fridman (1987).

A análise do período de disponibilidade de pólen, PPD, na Tabela 3, indica também a ocorrência de uma forte interação genótipo x

resposta ao fotoperíodo. O milho demonstra ser pouco variável nos dois regimes de luz, com intervalos de 20 a 17 dias, respectivamente para dias curtos e longos, enquanto os tipos selvagens revelaram maiores diferenças nas amplitudes de PPD nos dois fotoperíodos. Além disso, fica claro que o PPD é bem menor no tipo domesticado do que nos tipos selvagens nas duas condições de comprimento do dia. Em dias curtos, os teosintes da Seção Zea, CP e LR, *Z. mays mexicana*, menos sensíveis ao fotoperíodo, têm PPD também mais próximos. Os teosintes da Seção Luxuriantes, DP e LX, e o PH da Seção Zea, também mais sensíveis ao fotoperíodo, mostraram um PPD bem mais longo que o do milho. Por outro lado, em dias longos, a duração do PPD mostrou um resultado surpreendente, os teosintes CP e LR revelaram-se bem mais distantes do tipo domesticado que os DP, LX e PH. Isso poderia indicar que CP e LR são realmente mais próximos do milho, não pelo fato de pertencerem ao taxon considerado ancestral direto desse cereal, mas talvez porque seriam formas híbridas do tipo domesticado com os teosintes mais distantes. O PPD mais estreito no milho deve ser consequência da busca do homem por uma colheita concentrada num curto período de tempo, o que obviamente exige uma fase mais curta do florescimento. Para garantir uma granação perfeita da espiga, faz-se necessário uma grande disponibilidade de pólen no período concentrado de florescimento para que ocorra a polinização de todos os estilo-estigmas receptivos da inflorescência feminina.

O período de estilo-estigmas receptivo, PER, foi como era esperado, compatível com o PPD tanto para os tipos selvagens como para o cultivado, permitindo desse modo, que ocorressem tanto

autofecundações como cruzamentos ao acaso.

Os dados da Tabela 3 indicam que em média o início e fim da antese nas panículas terminal e dos ramos laterais, e o início e fim da saída de estigmas revelam que o milho é o tipo mais precoce, seguido dos teosintes anuais mexicanos, Central Plateau e Chalco Los Reyes, das espécies *diploperennis* e *luxurians*, e por fim da variedade *huehuetenanguensis*. Considerando-se a relação entre essas informações e a medida de sensibilidade (l-c), conclui-se que os tipos mais insensíveis são de fato os mais precoces, e que o processo de domesticação, também dentro do gênero *Zea*, levou a um aumento na precocidade e insensibilidade às variações do comprimento do dia.

A análise das características da reprodução sugere que o teosinte é, provavelmente, o ancestral do milho, tanto pela sua maior sensibilidade à luz, como pelo seu maior ciclo. Pela Tabela 3, pode-se verificar também que as raças Central Plateau e Chalco Los Reyes estão mais próximas do milho, e com ele compõem a Seção *Zea* de Doebley & Iltis (1980). Por sua vez, *Z. diploperennis* e *Z. luxurians* estão mais distantes do milho, e estreitamente relacionados entre si, confirmando também a classificação daqueles autores. A variedade *huehuetenanguensis*, entretanto, ao contrário da expectativa de Doebley & Iltis (1980), que a colocaram na Seção *Zea*, apresentou-se bem distanciada dos demais representantes da mesma, sendo o mais tardio dos teosintes analisados.

#### 4.1.2. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES.

As 20 plantas amostradas de cada uma das populações foram acompanhadas até os indivíduos completarem seu ciclo de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, com o objetivo de estudar o efeito do comprimento do dia em caracteres reprodutivos e morfológicos. Como observado na amostra anterior, as medidas, Tabela 4 e 5, de início e fim da ântese na panícula terminal (PTI e PTF), início e fim da ântese nas panículas dos ramos laterais (PRI e PRF), bem como início e fim da saída de estilo-estigmas (SEI e SEF), indicam que o tipo domesticado é pouco sensível às variações de dias longos e dias curtos, enquanto os teosintes mostram respostas completamente distintas nas duas condições. Fica evidente que para essas características reprodutivas, a norma de reação ao fotoperíodo é muito mais ampla nos tipos selvagens, em comparação ao tipo domesticado. Os teosintes, em dias curtos, ficaram bem mais precoces, respondendo da mesma forma que germoplasma domesticado, de variada procedência, respondeu a fotoperíodo menor nos experimentos de Francis (1970), em citação de Rood & Major (1980) e Spencer (1975). Os dados mostram ainda que CP e LR têm respostas semelhantes, num grupo, do mesmo modo que DP e LX compõem um grupo distinto. PH entretanto, mostra-se diferente dos demais. DP, LX e PH são os que mostraram maior sensibilidade ao fotoperíodo, o que é facilmente detectado pelas maiores diferenças, l-c, encontradas para os vários atributos. Por seu

turno, CP e LR têm sensibilidade intermediária ao regime de luz, estando situados entre milho e os teosintes DP, LX e PH.

A característica número de espigas, NE, na Tabela 5, revela que a variação encontrada nos dois regimes de luz, tanto para o tipo domesticado, como para os cinco teosintes, embora estatisticamente significativa em alguns casos, é de pequena magnitude. A grande diferença, como era esperado, corresponde ao número de espigas dos tipos selvagens, que oscila de cinco a seis vezes a mais em comparação ao tipo domesticado, mostrando a enorme redução do número de espigas em consequência do processo de domesticação. Essa é uma das características citadas por Harlan et al. (1973), Zeven & de Wet (1982) e Ashri (1989), como um dos indicadores da seleção efetuada pelo homem, submetendo espécies selvagens a mudanças para melhor servi-lo.

A porcentagem de plantas com dominância apical (DA) para cada uma das populações, mostrada na Tabela 5, foi obtida anotando-se as datas de saída de estilo-estigmas a partir dos nós mais próximos da panícula terminal, ao longo do colmo principal, variando do 4º ao 14º ramo lateral. Isso foi feito para verificar se a saída dos estilo-estigmas das espigas mais inferiores é dependente da saída de estilo-estigmas das espigas localizadas em nós mais superiores, num gradiente de prioridade a partir da panícula terminal. A avaliação da presença de dominância apical indicou que todas as cinco populações de teosinte apresentaram o mesmo comportamento nos dois regimes de luz. Mostraram ausência de dominância apical em dias longos, e evidências de sua ocorrência em dias curtos. Já o tipo cultivado mostrou

de sua ocorrência em dias curtos. Já o tipo cultivado mostrou dominância apical nas duas condições, revelando que as espigas imediatamente inferiores se desenvolvem na dependência das espigas superiores. Esses dados revelam que os teosintes apenas quando mudados de fotoperíodo longo para curto, comportam-se como o milho, revelando um certo grau de dominância apical. A dominância apical em teosintes, portanto, foi expressa apenas em condições de dias curtos, indicando que essa característica importante não é alterada apenas no tipo domesticado, em consequência da seleção artificial para maior produtividade. Mas é mudada também em consequência da maior plasticidade fenotípica dos tipos selvagens. O milho por ser domesticado, e ter sofrido seleção para maior produção de grãos, teve suas frequências gênicas alteradas, que permitem a expressão da dominância apical, mesmo quando cultivado em dias longos, o que não ocorre nos teosintes. Com a dominância apical, as espigas inferiores dependem das superiores para se desenvolver, tanto em relação à diferenciação das estruturas reprodutivas, como para seu desenvolvimento completo, como demonstraram Monteiro & Sharif (1985). A resposta do tipo cultivado, com forte dominância apical, está relacionada com o processo de domesticação (Galinat, 1988; Iltis, 1986), e também à intensa seleção artificial a que o milho tem sido submetido para alta produção em condições de alta densidade de população, pois como apontou Paterniani (1984), a espiga inferior só se desenvolve em condições ambientais adequadas, após a primeira se expressar totalmente.

Tabela 4. Média e Erro Padrão da Média para início (PTI) e fim (PTF) da ântese na panícula terminal e início (PRI) e fim (PRF) da ântese na panícula dos ramos laterais nas amostras de 20 plantas das seis populações (Pop) estudadas sob fotoperíodos curto (c) e longo (l).

Pop	PTI		PTF		PRI		PRF	
	$\bar{X}$	$s_x^-$	$\bar{X}$	$s_x^-$	$\bar{X}$	$s_x^-$	$\bar{X}$	$s_x^-$
CP c	61.90 ±	0.95	69.20 ±	1.01	67.90 ±	0.82	73.80 ±	0.87
l	137.15 ±	1.22	156.45 ±	1.42	151.10 ±	1.13	165.35 ±	0.79
LR c	73.00 ±	1.98	82.07 ±	2.04	82.00 ±	2.08	86.67 ±	1.99
l	136.15 ±	1.52	154.25 ±	1.46	149.20 ±	1.50	166.00 ±	1.24
DP c	78.45 ±	1.00	88.20 ±	1.05	88.25 ±	1.18	95.05 ±	1.19
l	169.00 ±	0.79	183.15 ±	1.04	178.20 ±	0.99	191.95 ±	0.89
LX c	86.85 ±	0.94	99.55 ±	1.21	99.85 ±	1.28	104.25 ±	1.21
l	174.70 ±	0.45	189.75 ±	0.46	185.00 ±	0.98	198.25 ±	1.01
PH c	119.00 ±	0.88	136.05 ±	1.13	136.85 ±	0.92	142.65 ±	0.91
l	217.40 ±	1.65	233.20 ±	1.41	232.00 ±	1.17	243.50 ±	0.96
M c	74.65 ±	0.88	86.30 ±	1.14	-	-	-	-
l	79.55 ±	1.02	91.10 ±	1.02	-	-	-	-

Tabela 5. Média e Erro Padrão da Média para início (SEI) e fim (SEF) da saída de estigmas, para o número de espigas contadas nos ramos laterais para verificar a ocorrência de Dominância Apical (NE) e para a dominância Apical (DA) nas amostras de 20 plantas das seis populações (Pop) estudadas em dias curtos(c) e longos(l).

Pop	SEI		SEF		NE		DA	
	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$
CP c	58.75 ±	1.04	62.40 ±	0.91	6.40 ±	0.40	1.15 ±	0.08
l	148.65 ±	0.84	153.60 ±	0.92	5.35 ±	0.33	0.25 ±	0.10
LR c	76.60 ±	2.17	80.07 ±	2.30	5.00 ±	0.31	1.13 ±	0.09
l	151.00 ±	1.28	154.85 ±	1.35	7.05 ±	0.65	0.20 ±	0.10
DP c	75.10 ±	1.43	80.25 ±	1.52	9.75 ±	0.47	1.05 ±	0.05
l	173.80 ±	0.84	179.40 ±	1.17	12.10 ±	0.55	0.05 ±	0.05
LX c	80.00 ±	1.00	84.00 ±	0.92	8.60 ±	0.17	1.05 ±	0.05
l	176.30 ±	0.56	183.45 ±	0.84	8.75 ±	0.35	0.05 ±	0.05
PH c	118.30 ±	0.93	124.80 ±	1.00	7.70 ±	0.24	1.00 ±	0.00
l	226.35 ±	1.30	232.45 ±	1.13	6.90 ±	0.25	0.05 ±	0.05
M c	81.00 ±	1.22	89.80 ±	2.12	1.25 ±	0.10	1.00 ±	0.00
l	82.00 ±	1.25	84.83 ±	1.18	2.00 ±	0.13	0.95 ±	0.005

O número de espiguetas masculinas em 5 cm da porção mediana da ráquis da panícula terminal, NEG, é mostrada na Tabela 6. Esse número expressa o grau de condensação de espiguetas, fornecendo uma estimativa indireta da eficiência da produção de grãos de pólen, uma vez que cada espiguetas tem duas flores e três anteras por flor. O milho apresentou um número médio de 51 espiguetas nos dois regimes de luz, o que representa um aumento da ordem de 40%, em comparação com seus parentes selvagens. Um maior índice de condensação implica em aumento da produção de pólen, possibilitando uma melhor polinização e conseqüentemente melhor granação e maior produtividade. Como foi mostrado que o período do florescimento é compactado no tipo domesticado, esse aumento da quantidade de pólen é também necessário para garantir a fertilização de um grande número de óvulos em intervalo de tempo mais curto do que nos tipos selvagens. O milho não apresentou diferenças significativas nos dois regimes de luz, enquanto vários teosintes responderam de forma distinta, porém de maneira pouco consistente.

Os dados de comprimento de espiguetas das porções inferior (CEI), média (CEM) e superior (CES) dos 5 cm médios da ráquis da panícula terminal, na Tabela 6, mostram que não houve diferença significativa ao se comparar as medidas entre os três segmentos da ráquis. Vamos considerar conseqüentemente, apenas o comprimento da porção média (CEM). Observa-se que CP, e principalmente PH têm tamanho de espiguetas reduzido em relação aos outros teosintes e milho em dias longos, embora os dois estejam em Seções diferentes. Somente o milho

teve o tamanho das espiguetas reduzido em dias curtos, enquanto os teosintes, ao contrário, tiveram um aumento dessa variável, com exceção do Chalco Los Reyes, cujo tamanho ficou inalterado.

Tabela 6. Média e Erro Padrão da Média para o número de espiguetas da ráquis da panícula terminal (NEG), para o comprimento de espiguetas das porções inferior (CEI), média (CEM) e superior (CES) da ráquis da panícula terminal das amostras de 20 plantas das seis populações (Pop) estudadas em dias curtos (c) e longos (l).

Pop	NEG		CEI		CEM		CES	
	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$
CP c	24.20 ±	1.35	10.39 ±	0.26	10.46 ±	0.33	9.99 ±	0.26
l	26.70 ±	1.92	9.34 ±	0.25	9.33 ±	0.22	9.28 ±	0.23
LR c	24.07 ±	2.07	8.45 ±	0.28	8.32 ±	0.30	7.95 ±	0.31
l	27.30 ±	1.84	8.59 ±	0.31	8.46 ±	0.36	8.42 ±	0.37
DP c	25.75 ±	0.84	11.42 ±	0.20	11.92 ±	0.26	11.87 ±	0.25
l	25.80 ±	0.89	9.56 ±	0.22	9.83 ±	0.21	9.99 ±	0.23
LX c	25.85 ±	0.72	10.26 ±	0.19	10.15 ±	0.19	10.05 ±	0.21
l	20.50 ±	0.52	9.25 ±	0.11	9.35 ±	0.09	9.69 ±	0.11
PH c	31.60 ±	1.23	7.26 ±	0.11	7.30 ±	0.12	7.11 ±	0.13
l	27.10 ±	0.92	6.70 ±	0.12	6.62 ±	0.14	6.68 ±	0.15
M c	50.60 ±	2.76	9.17 ±	0.19	9.14 ±	0.17	9.03 ±	0.19
l	51.45 ±	2.30	9.81 ±	0.17	9.93 ±	0.17	9.95 ±	0.18

Observa-se na Tabela 7 que as médias da altura das plantas (ALT) de teosintes apresentaram reduções significativas de dias longos para dias curtos. Essas reduções foram da ordem de 54, 63, 64, 64 e 62% para CP, LR, DP, LX e PH respectivamente. O milho mostrou uma redução bem menor de 15% em dias curtos, o que pode ser explicado pela sua menor sensibilidade ao comprimento do dia. Esses dados mostram claramente as grandes reduções que podem ocorrer no porte do germoplasma selvagem, quando migra para regiões de mais baixa latitude, ou de forma correspondente quando há sua dispersão para locais de menor altitude.

As médias relativas ao peso seco da parte aérea (PSPA) são também mostradas na Tabela 7. Nota-se, assim como para a altura das plantas, que os tipos selvagens mostraram redução significativa quando crescem em dias curtos, correspondendo a 84, 95, 85, 75 e 79% para CP, LR, DP, LX e PH respectivamente. O milho reduziu a sua massa vegetativa apenas em 37%, valor esse bem inferior aos apresentados pelos seus parentes selvagens.

Como se tratam de gramíneas, nas quais em cada nó ocorre a inserção de apenas uma folha, e como o número de folhas foi sugerido por Russel & Stuber (1983a) como um parâmetro mais adequado para avaliar a duração da fase de crescimento vegetativo, a contagem do número de nós substituiu a contagem do número de folhas. Todos os teosintes apresentaram redução do número de nós do colmo principal (CND) em dias curtos. Nota-se pela Tabela 7, que os teosintes Central Plateau e Chalco Los Reyes tiveram redução de 53%, em fotoperíodo

curto. Para as espécies *diploperennis* e *luxurians* foi de 48%, e para a variedade *huehuetenanguensis* chegou a 57%. Por sua vez, no milho, essa alteração foi desprezível, mostrando que a norma de reação para essa característica, também é mais ampla nos tipos selvagens do que no tipo domesticado.

O número de perfilhos (NP) também foi estudado para avaliar o efeito do regime de luz nas populações estudadas. Os dados da Tabela 7, referentes a esse atributo mostram que sob fotoperíodo longo todos os teosintes apresentaram número de colmos variando de 2.5 a 4.3. Em dias curtos, entretanto, todos os teosintes apresentaram apenas um colmo, reduzindo significativamente o autosombreamento dentro da planta. Nota-se também que o número médio de perfilhos foi praticamente o mesmo para os teosintes anuais mexicanos, Central Plateau e Chalco Los Reyes, bem como para os representantes da Seção Luxuriantes. Por seu turno, *huehuetenanguensis* mostrou o maior número de perfilhos em comparação aos demais teosintes. O milho, nessas condições, não apresentou variação para essa característica.

As médias do número de ramos laterais (NR) do germoplasma selvagem acham-se na Tabela 8. Nota-se que em dias curtos os teosintes CP, LR e DP apresentaram reduções de 12, 31 e 16% do número de ramos laterais. A mesma tendência parece estar presente para os teosintes mais tardios LX e PH. Esses dados indicam também que a emissão de ramos laterais, na condição de fotoperíodo longo, não é afetada pelo maior perfilhamento, ao contrário do que sugeriu Iltis (1986), com o argumento de que o aumento de auto-sombreamento, provocado pela maior

densidade de colmos, inibiria a formação de ramos laterais. Pois o aumento de perfilhos, e como veremos adiante, do número de folhas e peso das plantas, indicam que essas condições de maior auto-sombreamento em dias longos, parece não afetar a formação de ramos laterais.

As médias do comprimento da folha média, CF, acham-se na Tabela 8. Verifica-se que o germoplasma selvagem em dias curtos apresenta reduções da ordem de 55 a 60%, enquanto que no milho essa redução foi de apenas 19%, mostrando também que essa é uma característica fortemente modificada em função do comprimento do dia nos tipos selvagens. Ainda na Tabela 8, nota-se que a largura da folha média (LF) dos teosintes reduziu significativamente em dias curtos, enquanto o milho apresentou uma redução desprezível. Esses dois últimos atributos permitiram estimar um índice de área foliar (Montgomery, 1911, citado por Allison & Daynard, 1979) através do produto comprimento x largura da folha média x 0.75 (Tabela 8), que mostrou ser significativamente alterado nos tipos selvagens, com reduções percentuais de 69, 81, 74, 74 e 73%, em dias curtos, para CP, LR, DP, LX e PH, respectivamente. O milho, por sua vez, mostrou uma redução menor, de 25%, em dias curtos.

Tabela 7. Média e Erro Padrão da Média para altura do colmo principal (ALT), peso seco da parte aérea (PSPA), número de nós do colmo principal (NN) e número de perfilhos (NP) nas amostras de 20 plantas das seis populações (Pop) estudadas em dias curtos (c) e longos (l).

Pop	ALT		PSPA		NN		NP	
	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$
CP c	159.80 ±	6.35	56.71 ±	8.84	9.95 ±	0.45	1.00 ±	0.00
l	346.35 ±	8.53	364.38 ±	39.01	19.60 ±	0.47	2.55 ±	0.18
LR c	129.40 ±	5.23	23.33 ±	4.09	9.20 ±	0.39	1.00 ±	0.00
l	346.55 ±	9.32	492.23 ±	63.47	20.80 ±	0.52	2.95 ±	0.37
DP c	154.35 ±	5.40	85.69 ±	10.88	12.30 ±	0.36	1.00 ±	0.00
l	424.20 ±	4.44	571.77 ±	46.38	25.60 ±	0.53	3.40 ±	0.23
LX c	178.05 ±	3.76	90.58 ±	9.38	13.05 ±	0.33	1.00 ±	0.00
l	492.65 ±	4.33	366.21 ±	32.75	23.30 ±	0.44	3.15 ±	0.22
PH c	179.50 ±	6.15	87.74 ±	9.30	13.90 ±	0.43	1.00 ±	0.00
l	477.15 ±	7.14	413.32 ±	31.94	32.40 ±	0.65	4.30 ±	0.33
M c	309.15 ±	8.59	161.63 ±	11.72	16.70 ±	0.18	1.00 ±	0.00
l	362.00 ±	7.01	255.73 ±	17.66	17.60 ±	0.34	1.00 ±	0.00

Tabela 8. Média e Erro Padrão da Média para número de ramos do colmo principal (NR), comprimento da folha média (CF), largura da folha média (LF) e índice da Área Foliar nas amostras de 20 plantas das seis populações (Pop) estudadas em dias curtos (c) e longos (l).

Pop	NR		CF		LF		Índice de Área Foliar (cm <sup>2</sup> )
	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{X}$	$s_{\bar{x}}$	
CP c	6.43 ±	0.13	39.92 ±	2.30	5.33 ±	0.26	159.58
l	7.31 ±	0.19	89.33 ±	2.70	7.70 ±	0.20	515.88
LR c	5.82 ±	0.18	35.18 ±	1.62	3.93 ±	0.18	103.69
l	8.45 ±	0.25	88.84 ±	2.60	8.14 ±	0.30	542.37
DP c	9.72 ±	0.23	38.53 ±	1.28	4.26 ±	0.18	123.10
l	11.55 ±	0.28	92.13 ±	1.55	6.94 ±	0.14	479.54
LX c	8.76 ±	0.12	46.42 ±	2.04	4.92 ±	0.13	171.29
l	8.79 ±	0.15	116.68 ±	2.66	7.57 ±	0.22	662.45
PH c	7.49 ±	0.15	46.08 ±	2.27	4.48 ±	0.17	154.83
l	7.81 ±	0.18	111.65 ±	2.61	6.96 ±	0.17	582.81
M c	-		92.91 ±	3.04	9.73 ±	0.28	678.01
l	-		115.38 ±	2.89	10.38 ±	0.22	898.23

Em relação ao número de infrutescências produzidas, NI, observa-se na Tabela 9, que os teosintes anuais mexicanos, CP e LR, em dias curtos, reduziram a produção das mesmas em 60 e 78%, respectivamente, enquanto *Z. diploperennis* e *Z. luxurians* mostraram reduções de 16 e 6%, respectivamente. Já o milho não apresentou alteração para essa variável. Quanto ao *huehuetenanguensis*, houve uma resposta contrária aos demais, isto é, esse taxon aumentou a produção do número de infrutescências em 34% sob fotoperíodo curto, mostrando, mais uma vez, ser bem diferente dos outros teosintes.

O peso de grãos, PG, (Tabela 9) mostrou resposta bem parecida à obtida para número de infrutescências, e foi usado para a estimativa da relação peso de grãos/peso de massa vegetativa. Tanto o peso de grãos como o número de infrutescências foram reduzidos quando cultivados em dias curtos, provavelmente em função da forte redução do porte das plantas, observada nessas condições. A redução do porte ocorreu em consequência da diminuição no número de nós, e também do encurtamento dos internódios, consequentemente reduzindo o número de inflorescências femininas, pois essas se inserem nos nós. Logo a diminuição da produção de grãos dos teosintes deve ser atribuída às alterações morfológicas das plantas em decorrência do florescimento mais precoce. O milho, como seria esperado em época normal de semeadura, apresentou aumento significativo do peso de grãos.

Todos os teosintes, quando cultivados sob fotoperíodo curto, tiveram suas relações grãos/massa aumentadas (Tabela 9), com ganhos de 78, 69, 81, 67 e 93% para CP, LR, DP, LX e PH, respectivamente. Esses

resultados são graficamente mostrados na Figura 1. Isso significa que, o germoplasma selvagem em dias longos estende ao máximo seu crescimento vegetativo, e a energia luminosa captada é canalizada preferencialmente para a produção de massa verde, baixando conseqüentemente a produção de grãos. Em dias curtos, ao contrário, os teosintes tornam-se mais precoces e mais eficientes para a produção de grãos, reduzindo sua massa vegetativa, em favor da produção de grãos. O milho, já mostrou uma menor alteração para as várias características estudadas nas duas condições de cultivo, revelando uma estreita norma de reação, que deve ser resultado da enorme pressão de seleção imposta na domesticação, e mais tarde em programas de melhoramento realizados pelos indígenas, agricultores e melhoristas. Comparando-se as alterações morfofisiológicas dos tipos selvagens e do tipo domesticado com as estratégias de seleção *K* e seleção *r*, sugeridas por Pianka (1974), citado por Shorrocks (1978), tem-se duas considerações a fazer. A primeira é que nas condições de dias longos, os teosintes expressam uma estratégia *K*, pois mostram desenvolvimento lento, reprodução mais tardia, tempo de vida mais longo, alguns com hábito perene, altura maior dos indivíduos e maior eficiência. Entretanto, em dias curtos observou-se uma grande mudança nos tipos selvagens que passaram a ter desenvolvimento rápido, reprodução precoce, tempo de vida relativamente curto, altura menor dos indivíduos, e maior produtividade, portanto expressando a estratégia *r*. A segunda é que o milho, obviamente, mostra apenas características de espécie *r* em qualquer meio que vegete. Isso sugere que os teosintes, por serem

selvagens, têm frequências gênicas distintas que os permitem reponder com estratégias  $r$  ou  $K$ , induzindo o florescimento desses taxa, quer pelo fotoperíodo ou pela temperatura.

Tabela 9. Média e Erro Padrão da Média para número de infrutescências (NI), peso de grãos (PG) e relação peso de grãos/peso de massa vegetativa (G/M) nas amostras de 20 plantas das seis populações (Pop) estudadas em dias curtos (c) e longos (l).

Pop	NI		PG		G/M
	$\bar{x}$	$\sigma_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$\sigma_{\bar{x}}$	
CP c	20.50 ±	2.18	25.41 ±	4.73	0.45
l	51.10 ±	7.01	37.73 ±	5.68	0.10
LR c	14.53 ±	1.88	6.15 ±	1.30	0.26
l	65.55 ±	7.18	40.90 ±	5.60	0.08
DP c	75.10 ±	7.50	40.10 ±	4.68	0.47
l	89.50 ±	8.19	50.82 ±	4.41	0.09
LX c	31.80 ±	3.63	35.69 ±	4.69	0.39
l	34.00 ±	3.31	48.58 ±	4.73	0.13
PH c	50.00 ±	4.19	24.13 ±	1.94	0.28
l	37.20 ±	4.43	7.43 ±	1.24	0.02
M c	259.30 ±	12.97	54.44 ±	6.05	0.34
l	544.30 ±	27.22	158.56 ±	17.88	0.62

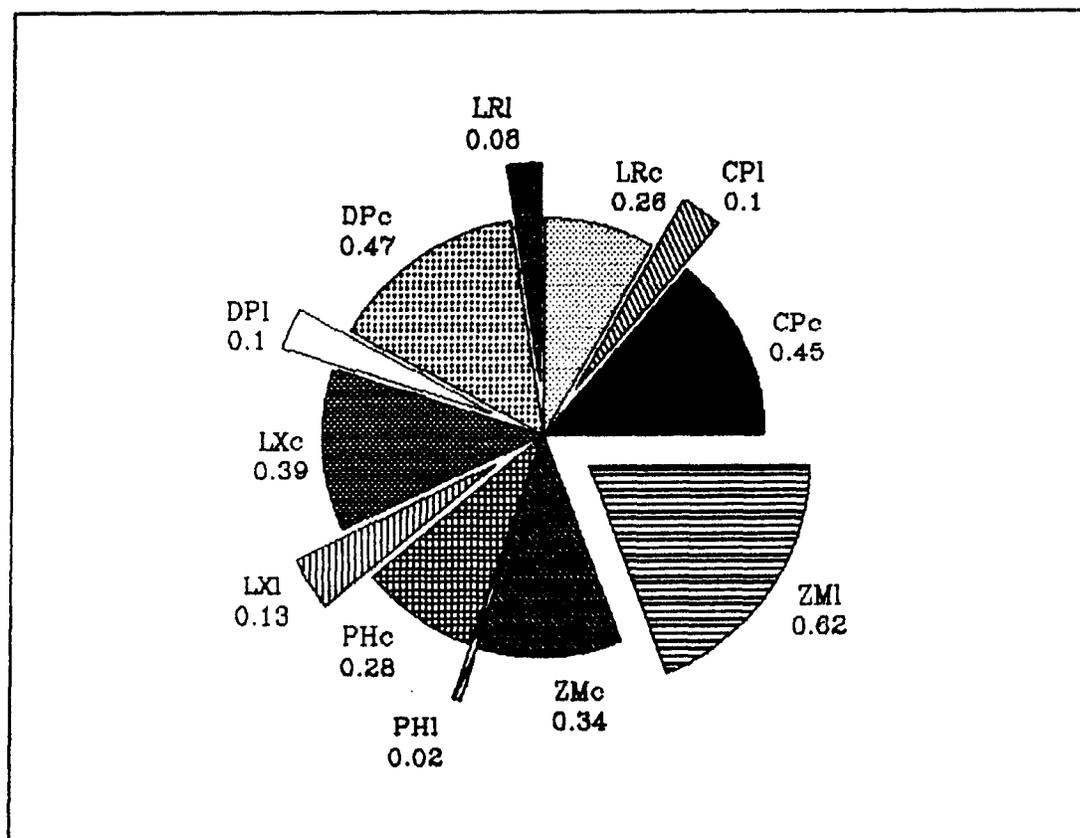


Figura 1. Gráfico representativo das alterações detectadas na relação Grãos/Massa vegetativa das populações de teosintes e milho estudadas sob fotoperíodo curto (c) e fotoperíodo longo (l). CP - *Zea mays mexicana* (raça Central Plateau), LR - *Z. mays mexicana* (raça Chalco Los Reyes), DP - *Z. diploperennis*, LX - *Z. luxurians*, PH - *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* e ZM - *Z. mays mays*.

#### 4.1.3. ANÁLISE CANÔNICA E FENÉTICA.

Dois conjuntos de dados foram estudados separadamente. Um para o estudo da fenologia reprodutiva apenas, envolvendo características reprodutivas das plantas, em amostra de uma centena de indivíduos de cada população, em média. Outro conjunto de dados foi tomado em amostras de vinte plantas de cada população, envolvendo além das características reprodutivas, outros 14 atributos dos indivíduos. Os dois conjuntos de dados foram usados para análise canônica e análise fenética do germoplasma estudado.

Quanto a fenologia reprodutiva, foram observados o início e o fim da ântese nas panículas terminais, o início e o fim da ântese nas panículas dos ramos laterais e o início e o fim da saída de estigmas, observados nas amostras de cerca de 110 plantas retiradas ao acaso de cada população. Esse conjunto de observações, bem como o de todas as características, permitiu a avaliação do grau de similaridade entre as populações de teosintes e milho, cultivadas sob dias curtos e dias longos. Os dois tipos de análise foram aplicados às duas amostragens em separado, tendo-se obtido padrões semelhantes de discriminação, indicando que a amostra de apenas 20 plantas, com 20 características, foi suficiente para caracterizar cada população. Desse modo passaremos a mostrar e discutir apenas os dados dessas amostras.

No plantio de dias curtos, a análise canônica indicou que a variável CAN1 apresentou maior significância como um fator

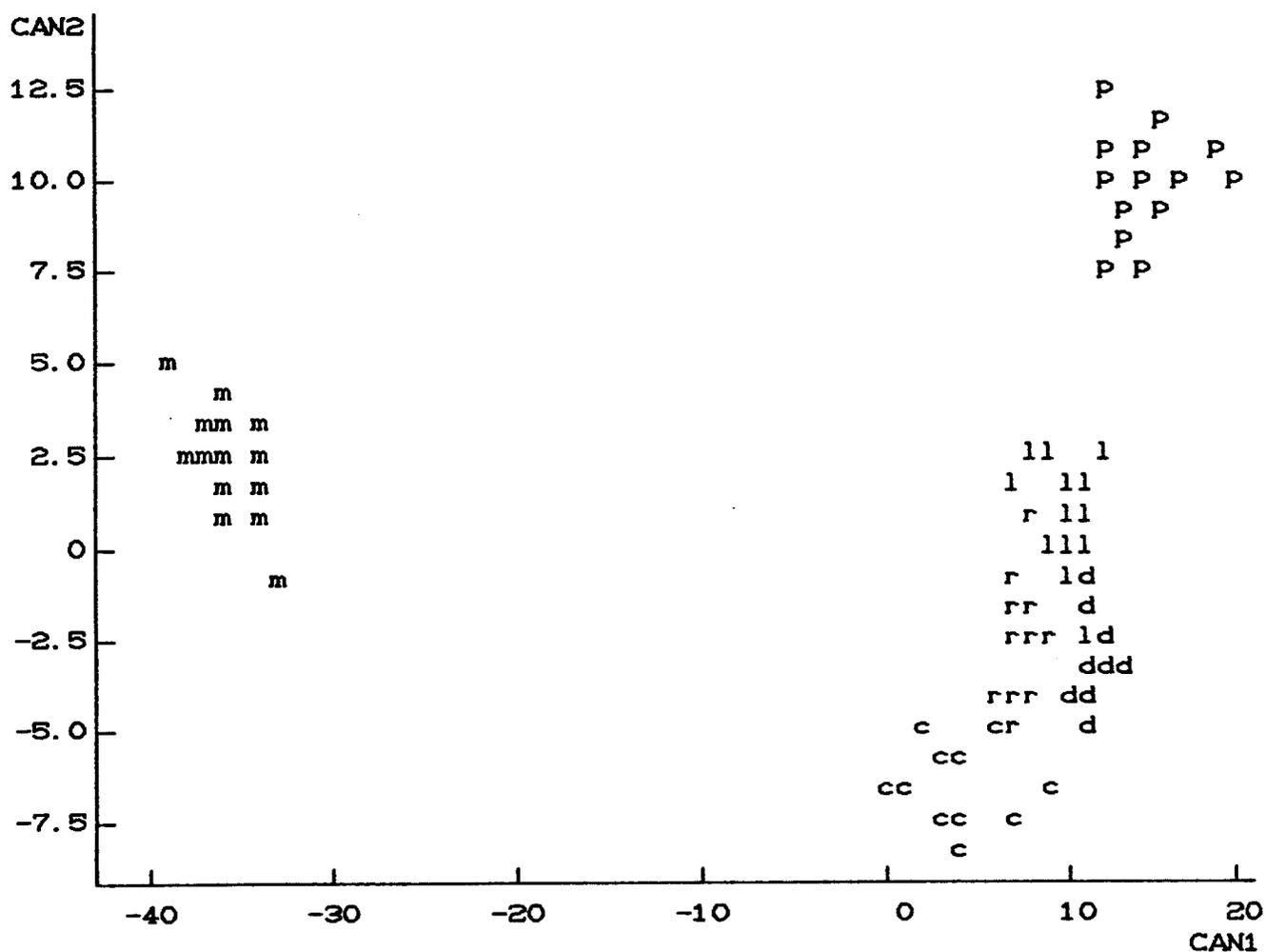
discriminante na proporção de 0,907. O início e o fim da ântese nas panículas terminais e o início e o fim da ântese nas panículas dos ramos laterais foram as características que tiveram os maiores coeficientes canônicos, 0,916, 0,928, 0,929 e 0,938 respectivamente, consistindo nos principais fatores responsáveis pela discriminação das seis populações.

A Figura 2 mostra que a variável CAN1 separa o germoplasma em dois grupos principais, o milho (m) com valores negativos, e os teosintes (c, r, d, l e p) com valores positivos. Analisando-se o eixo da variável CAN2, constata-se a existência de um agrupamento sequencial dos teosintes, com o seguinte padrão: um primeiro grupo formado pelos teosintes anuais da subespécie *Z. mays mexicana*, representado por Central Plateau (c) e Chalco Los Reyes (r), um segundo composto pelos representantes da Seção Luxuriantes, a espécie perene, *Z. diploperennis* (d) e a espécie anual, *Z. luxurians* (l). Por fim, aparece isoladamente o *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* (p).

As distâncias de Mahalanobis (Tabela 10) estimadas para o germoplasma cultivado em dias curtos, serviram à análise fenética do mesmo, possibilitando a construção do fenograma da Figura 3. Nota-se que os teosintes anuais mexicanos, Central Plateau e Chalco Los Reyes, e as espécies *Z. diploperennis* e *Z. luxurians* agruparam-se dois a dois, em "clusters" distintos, evidenciando a forte similaridade existente dentro dos mesmos. A variedade *huehuetenanguensis* se ligou num nível intermediário ao milho e demais teosintes. Finalmente já bem

mais distante, ocorre a associação entre o milho e seus parentes selvagens, confirmando o que foi demonstrado na análise canônica.

Figura 2. Gráfico representativo da discriminação feita pela Análise Canônica para seis variáveis de padrão de florescimento e quatorze características complementares medidas nas amostras pequenas, 20 plantas, das seis populações estudadas em dias curtos.

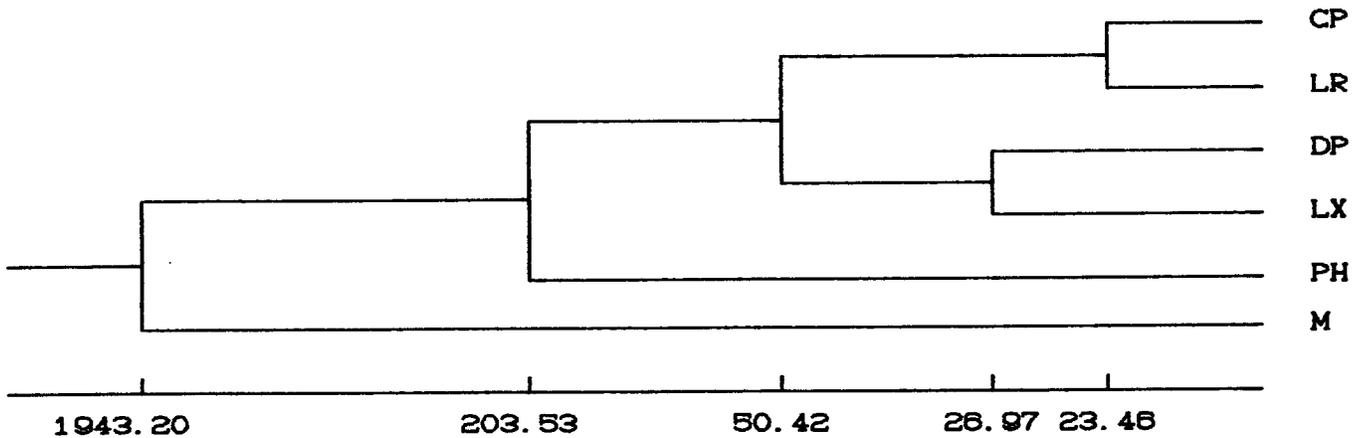


- c - *Zea mays mexicana* (Central Plateau).
- r - *Z. mays mexicana* (Los Reyes).
- d - *Z. diploperennis*.
- l - *Z. luxurians*.
- p - *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*.
- m - *Z. mays mays*.

Tabela 10. Distâncias de Mahalanobis estimadas a partir de seis variáveis de fenologia reprodutiva e de quatorze características complementares das amostras de 20 plantas coletadas durante o plantio de dias curtos no germoplasma: *Z. mays mexicana* raça Central Plateau (CP), *Z. mays mexicana* raça Chalco Los Reyes (LR), *Z. diploperennis* (DP), *Z. luxurians* (LX), *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* (PH) e *Z. mays mays* (M).

Germoplasma	CP	LR	DP	LX	PH	M
CP	0					
LR	23.46	0				
DP	52.23	45.89	0			
LX	65.28	38.28	26.97	0		
PH	314.29	194.04	185.96	119.83	0	
M	1636.00	1747.00	1907.00	1946.00	2480.00	0

Figura 3. Fenograma baseado nas distâncias de Mahalanobis estimadas a partir de dados da fenologia reprodutiva e das características morfofisiológicas de populações de teosintes e milho cultivadas sob fotoperíodo curto. *Zea mays mexicana* (CP e LR), *Z. diploperennis* (DP), *Z. luxurians* (LX), *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* (PH) e *Z. mays mays* (M). Tipo de agrupamento - UPGMA.



Levando-se em conta o plantio de dias longos, observa-se que a variável CAN1 continuou apresentando maior significância como um fator discriminante na proporção de 0,946. As seis características que apresentaram coeficientes canônicos significativos, e desse modo discriminaram bem o germoplasma foram: o início e o fim da ântese nas panículas terminais (0,927 e 0,943), o início e o fim da ântese nas panículas dos ramos laterais (0,997 e 0,999) e o início e o fim da saída de estigmas nas inflorescências pistiladas (0,947 e 0,938).

Do mesmo modo que na condição de dias curtos, agora em dias longos, a Figura 4 mostra que houve novamente a separação do germoplasma em dois grupos bem evidentes. Tomando como referencial o eixo da variável CAN1, observa-se a distribuição do milho (m) com valores negativos e a dos teosintes (c, r, d, l e p) com valores positivos. Nota-se também que houve uma inversão na sequência dos grupos de teosintes, em relação à distribuição observada na análise canônica dos dados de dias curtos. Como em dias curtos, também em dias longos ficou isolada a população *huehuetenanguensis* (p) em relação aos outros representantes selvagens. A seguir, tem-se a associação das espécies *diploperennis* (d) e do *luxurians* (l). E por último surgem os teosintes anuais mexicanos Central Plateau (c) e Chalco Los Reyes (r). Observa-se que nas condições de dias longos, há uma melhor discriminação dos grupos de teosintes em comparação à encontrada em dias curtos. Isso sugere a importância da amostragem de diferentes condições ambientais em estudos fenéticos, devido a expressão fenotípica diferencial das populações estudadas.

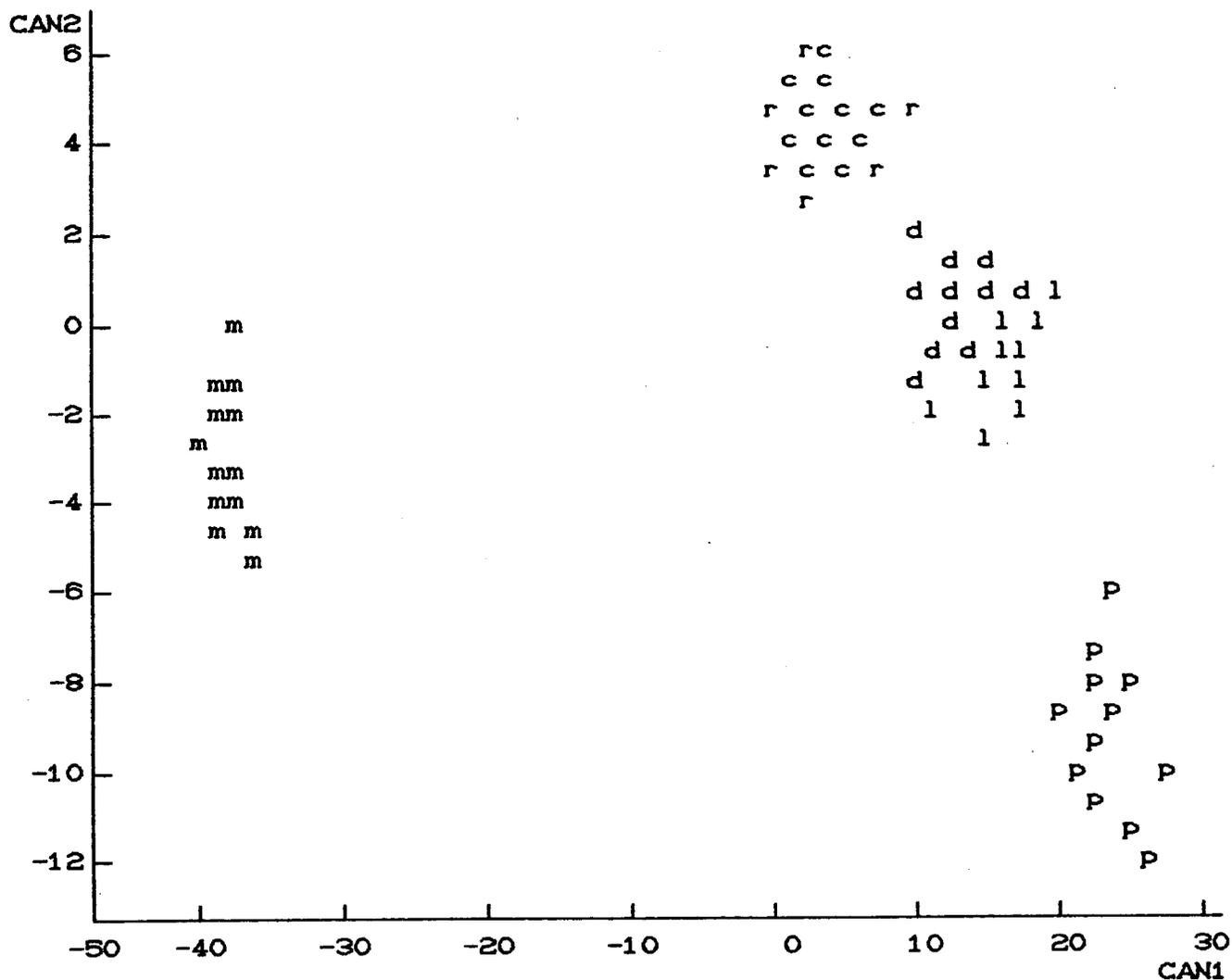
O fenograma da Figura 5 foi construído a partir das distâncias de Mahalanobis estimadas em regime de dias longos (Tabela 11), nota-se claramente a repetição do padrão obtido em dias curtos. Esses resultados mostram que apesar do regime de luz produzir mudanças na arquitetura e nas características reprodutivas, principalmente dos tipos selvagens quando cultivados em dias longos, há manutenção das relações fenéticas entre os vários teosintes e milho estudados. Tais observações indicam que as diferenças registradas entre as características das seis populações estudadas devem ser atribuídas a genes, cujas frequências foram alteradas de forma específica nos seis taxa, em consequência da seleção natural nos teosintes e principalmente seleção artificial no milho.

Esses dados mostram a similaridade existente entre os dois teosintes anuais mexicanos, bem como a proximidade entre as populações de *diploperennis* e *luxurians*, colocados coerentemente por Doebley & Iltis (1980) na Seção Luxuriantes, em função da morfologia da cúpula e da espiguetta masculina. O milho, taxon cultivado, como era de se esperar, devido ao forte efeito da domesticação, situou-se bem distante dos demais, em consequência das grandes mudanças, tanto no que diz respeito à sua morfologia, como às demais características alteradas para servir ao homem. Surpreendente foi a posição mostrada pelo *huehuetenanguensis*, com comportamento bem distinto dos demais, e que foi colocado por Doebley & Iltis (1980) na Seção Zea, ao lado do milho e dos teosintes anuais mexicanos. Os nossos dados, envolvendo características reprodutivas e morfológicas não dão suporte para esse

ponto específico da classificação de Doebley & Iltis (1980). Ao contrário apontam a necessidade da reformulação de sua localização taxonômica que considerou apenas atributos de espiguetas das inflorescências masculinas e forma da cúpula. Essa preocupação é compatível com uma recente proposta feita por Doebley (1990b), ou seja, que *huehuetenanguensis* deve ser elevado de variedade para a categoria de subespécie, em razão do seu comportamento único, pois segundo aquele pesquisador esse taxon mostra padrões isoenzimáticos, morfológicos e de genomas nuclear e citoplasmático, totalmente diversos daqueles apresentados pelos demais teosintes.

Os resultados obtidos indicam que as características de fenologia reprodutiva, face a resposta das plantas ao fotoperíodo e certamente à altitude, usadas no presente trabalho, são fatores relevantes na discriminação dos representantes do gênero *Zea*. Essas características permitiram ainda que se detectasse a posição única da variedade *huehuetenanguensis* (Mastenbroek et al., 1981; Doebley et al., 1984), sugerindo a necessidade de uma revisão na classificação taxonômica desse taxon, em comparação aos outros componentes do gênero *Zea*, pois *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* parece não se situar bem em nenhuma das duas Seções ora aceitas, *Zea* e *Luxuriantes*, e que talvez mereça, pelo menos como hipótese, ser considerado até com o "status" de espécie.

Figura 4. Gráfico representativo da discriminação feita pela Análise Canônica para seis variáveis de padrão de florescimento e quatorze características complementares medidas nas amostras pequenas, 20 plantas, das seis populações estudadas em dias longos.



c - *Zea mays mexicana* (Central Plateau).

r - *Z. mays mexicana* (Los Reyes).

d - *Z. diploperennis*.

l - *Z. luxurians*.

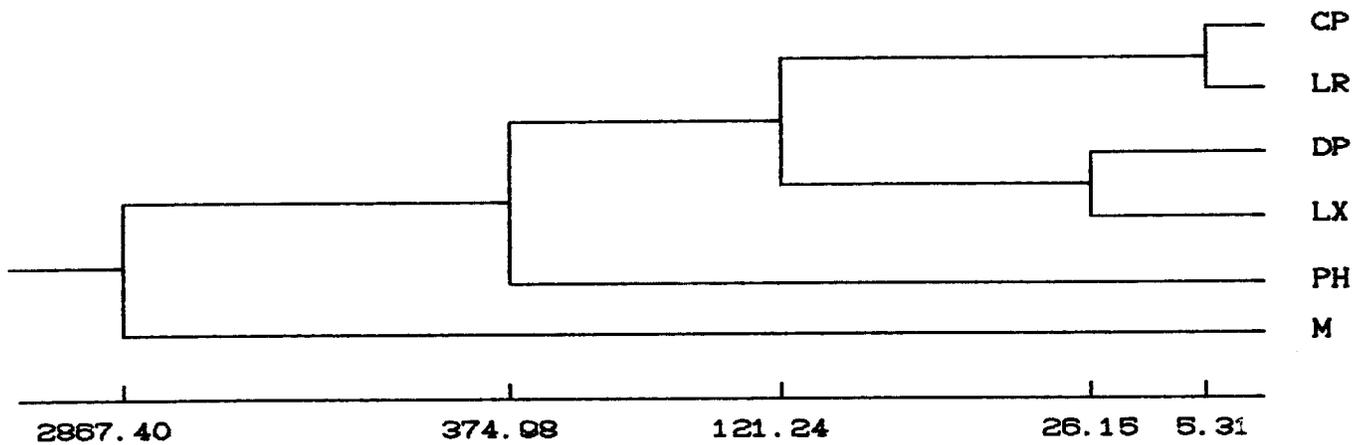
p - *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*.

m - *Z. mays mays*.

Tabela 11. Distâncias de Mahalanobis estimadas a partir de seis variáveis de fenologia reprodutiva e de quatorze características complementares das amostras de 20 plantas coletadas durante o plantio de dias longos no germoplasma: *Z. mays mexicana* raça Central Plateau (CP), *Z. mays mexicana* raça Chalco Los Reyes (LR), *Z. diploperennis* (DP), *Z. luxurians* (LX), *Z. mays parviglumis huahuatenanguensis* (PH) e *Z. mays mays* (M).

Germoplasma	CP	LR	DP	LX	PH	M
CP	0					
LR	5.31	0				
DP	101.86	96.25	0			
LX	144.24	142.61	26.15	0		
PH	543.45	518.62	248.96	188.99	0	
M	2105.00	2128.00	2818.00	3026.00	4260.00	0

Figura 5. Fenograma baseado nas distâncias de Mahalanobis estimadas a partir de dados da fenologia reprodutiva e das características morfofisiológicas de populações de teosintes e milho cultivadas sob fotoperíodo longo. *Zea mays mexicana* (CP e LR), *Z. diploperennis* (DP), *Z. luxurians* (LX), *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* (PH) e *Z. mays mays* (M). Tipo de agrupamento - UPGMA.



#### 4.2. ESTIMATIVA DE TAXA DE CRUZAMENTO.

A estimativa da taxa de cruzamento em populações naturais ou selecionadas, fazendo uso de marcadores isoenzimáticos depende da ocorrência de sistemas polimórficos para os peptídeos em questão. Dos sistemas de isoenzimas testados no presente trabalho, verificou-se que somente dois, ADH-1 e GOT-1, se mostraram heteromórficos. ADH-1 para *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* e GOT-1 para *Z. mays mexicana* (Craças Central Plateau e Chalco Los Reyes), *Z. mays mays* (milho mazóide) e *Z. diploperennis*.

Como já existem informações consistentes na literatura sobre os padrões de bandas desses sistemas, tanto em milho como em teosintes (Stuber et al., 1988; Doebley et al., 1984), não houve necessidade da realização de cruzamentos específicos para observar a segregação dos mesmos.

A espécie *Z. luxurians* não apresentou variabilidade para nenhum dos sete sistemas de isoenzimas testados, o que impossibilitou a estimativa da sua taxa de cruzamento através da técnica de eletroforese.

Na Tabela 12 são apresentadas as estimativas da taxa de cruzamento de teosintes e milho, cultivados sob fotoperíodos curto e longo. Para os teosintes da subespécie *mexicana*, não se verificou alteração na taxa de cruzamento ( $\lambda$ ) nas amostras submetidas aos dois regimes de luz, ficando com  $\lambda = 1,00$ . Esses dados indicam que cruzamentos ao acaso ocorrem em alta frequência nesses teosintes. Para

o milho, as taxas de cruzamento foram consideradas como 1,00 nas duas situações. Esses resultados estão próximos aos valores de  $\lambda$  obtidos por Kahler et al. (1984), que fizeram uso dessa técnica para investigar a estratégia reprodutiva de populações experimentais de milho, relatando uma taxa de cruzamento em torno de 90% para oito sistemas enzimáticos, com valores oscilando de 81 a 100%, conforme o peptídeo considerado.

A taxa de cruzamento em *diploperennis* teve valores de  $\lambda = 1,00$  tanto para os dias curtos como para os longos, mostrando que esse representante da Seção Luxuriantes não diferiu daqueles pertencentes à Seção Zea nas duas condições em que foram feitas as observações. Já *huehuetenanguensis*, em dias curtos, mostrou um valor de  $\lambda = 0,62$ , o que sugere ter havido não só cruzamentos ao acaso como também autofecundações, portanto, com um comportamento distinto daquele em dias longos, com  $\lambda = 1,00$ . Como se tratou de um valor de taxa de cruzamento bastante distinto dos outros nove analisados, uma nova amostra deverá ser analisada, numa próxima oportunidade, para que se possa tentar explicar a natureza do desvio observado.

Os valores obtidos para taxa de cruzamento em dias curtos e dias longos, de modo geral, não forneceram subsídios para evidenciar que o fotoperíodo afeta a taxa de cruzamento de teosintes e de milho, sugerindo ser essa uma característica fortemente conservada. Desse modo não se tem também nenhuma evidência para suspeitar que a domesticação tenha alterado a taxa de cruzamento no tipo cultivado, apesar das grandes mudanças fenotípicas impostas ao taxon pela seleção artificial.

Tabela 12. Frequências genótípicas, teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e taxa de cruzamento ( $\lambda$ ) de quatro populações de teosintes (CP, LR, PH e DP) e uma de milho (M), estimadas através de análises isoenzimáticas nos sistemas GOT-1(1) e ADH-1(2), cultivadas sob fotoperíodos curto (c) e longo (l). Os valores entre parênteses indicam as frequências genótípicas esperadas em condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Pop	Amostra	Genótipos			$\lambda$	$\chi^2_{1GL}$	Nível de Significância	
		1/1	1/2	2/2				
CP <sub>1</sub>	c	146	39 (36)	67 (73)	40 (37)	1.00	0.98 <sub>NS</sub>	0.50 > p > 0.25
	l	70	14 (16)	39 (35)	17 (19)	1.00	0.92 <sub>NS</sub>	0.50 > p > 0.25
LR <sub>1</sub>	c	142	41 (48)	82 (69)	19 (25)	1.00	4.91*	0.05 > p > 0.025
	l	87	33 (34)	42 (41)	12 (12)	1.00	0.05 <sub>NS</sub>	0.90 > p > 0.75
PH <sub>2</sub>	c	129	23 (16)	45 (59)	61 (54)	0.62	7.29*	0.01 > p > 0.005
	l	86	4 (6)	38 (34)	44 (46)	1.00	1.23 <sub>NS</sub>	0.50 > p > 0.25
DP <sub>1</sub>	c	152	136 (137)	18 (15)	- -	1.00	0.07 <sub>NS</sub>	0.90 > p > 0.75
	l	100	91 (89)	7 (10)	2 (1)	1.00	1.13 <sub>NS</sub>	0.50 > p > 0.25
M <sub>1</sub>	c	153	14 (13)	61 (63)	78 (77)	1.00	0.15 <sub>NS</sub>	0.75 > p > 0.50
	l	135	6 (8)	55 (50)	74 (77)	1.00	1.12 <sub>NS</sub>	0.50 > p > 0.25

\* valor de  $\chi^2$  significativo ao nível de 5% de significância.

NS valor de  $\chi^2$  não significativo.

#### 4.3. DORMÊNCIA EM TEOSINTES.

Embora Wilkes (1967) tenha observado a pronta germinação de sementes de teosintes recém colhidas, portanto, sem dormência, observou-se no presente trabalho, como também mostrou Galinat (1988), que os teosintes possuem um efeito de dormência logo após a colheita dos frutos das plantas. Esse fato despertou nosso interesse em investigar um pouco mais o assunto, pelas suas implicações no processo de dispersão do tipo selvagem, e conseqüentemente na domesticação do tipo cultivado, bem como para ganhar conhecimento, visando induzir a rápida germinação das suas sementes para as análises de eletroforese, logo após a colheita.

Os resultados dos experimentos de germinação realizados em Outubro de 1990, dois meses após a colheita, e Abril de 1991, oito meses após a colheita foram submetidos a uma análise de variância, cujos valores de F estão na Tabela 13. Os resultados dessa análise indicam que existem diferenças significativas na germinação das cinco populações de teosinte. O efeito da retirada da cúpula, ou seja, do invólucro que reveste os frutos foi altamente significativo nesse experimento. Essas diferenças devem ser atribuídas provavelmente a fatores químicos ou físicos, uma vez que em nosso laboratório tem-se verificado que a textura da cúpula não parece ser alterada com o tempo de armazenamento em câmara com umidade de 40 a 50% e temperatura ao redor de 20°C. Nesses experimentos de germinação ficou evidenciado que a retirada da cúpula promove a imediata germinação, e desse modo acredita-se estar nela o agente inibidor da germinação, possivelmente

uma substância química que causa a dormência como uma adaptação natural dos tipos selvagens, como tem sugerido Harlan et al. 1973. A interação teosinte x cúpula não foi significativa, indicando que os vários teosintes apresentam o mesmo efeito de dormência. A ocorrência de interação teosinte x época significativa indica que os teosintes não se comportam relativamente de uma mesma maneira quanto a germinação nas duas épocas estudadas. A interação cúpula x época não significativa indica que o efeito de dormência se expressou igualmente nas duas épocas, dois e oito meses após a colheita.

O efeito de época, significativo, indica que houve uma redução na média de germinação oito meses após a colheita. Tais diferenças podem ser vistas na Tabela 14. Observa-se que o efeito de dormência, avaliado em função da retirada da cúpula, é significativo, mesmo oito meses após a colheita dos frutos dos teosintes.

Fica evidenciado, que ao contrário das observações de Wilkes (1967), há dormência nos taxa selvagens, possivelmente como uma estratégia para impedir a pronta germinação dos mesmos, só o fazendo em condições ambientais mais favoráveis. Essa estratégia, como sugere Galinat (1988), dá oportunidade para que as plantas germinem, distantes umas das outras, permitindo uma melhor disseminação, ou para evitar a formação de populações com alta densidade de plântulas, que provoca sombreamento excessivo, impedindo que as plantas diferenciem seus colmos e ramos laterais, conseqüentemente limitando seu desenvolvimento. A dormência no milho teria sido eliminada com a retirada natural das cúpulas dos frutos através de mutação e/ou através da seleção artificial no processo da domesticação.

Tabela 13. Valores de F estimados em análise de variância de experimento de germinação, envolvendo os teosintes *Zea mays mexicana* (Central Plateau e Chalco Los Reyes), *Z. diploperennis*, *Z. luxurians* e *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* em duas épocas: dois meses e oito meses após a colheita.

Fonte de variação	GL	F	P > F
teosinte	4	4.04	0.60
cúpula	1	345.75	0.01
época	1	44.25	0.01
teosinte * cúpula	4	1.08	37.49
teosinte * época	4	5.04	0.14
cúpula * época	1	1.60	21.10
teosinte * cúpula * época	4	1.87	12.83

Tabela 14. Médias das porcentagens da germinação dos cinco teosintes, dois meses e oito meses após a colheita, em tratamentos com e sem cúpula. *Z. mays mexicana* (CP e LR), *Z. diploperennis* (DP), *Z. luxurians* (LX) e *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*.

	Dois Meses		Oito Meses	
	com cúpula	sem cúpula	com cúpula	sem cúpula
CP	46.0 ± 4.21	91.0 ± 4.53	15.5 ± 2.18	49.8 ± 3.11
LR	44.7 ± 9.36	89.5 ± 5.23	20.2 ± 4.46	65.8 ± 4.66
DP	31.5 ± 9.56	70.5 ± 5.24	12.0 ± 5.02	83.0 ± 1.47
LX	43.0 ± 1.69	87.2 ± 3.71	27.2 ± 4.50	77.7 ± 3.82
PH	43.0 ± 5.51	92.8 ± 1.89	31.5 ± 14.02	85.5 ± 2.54
Médias	41.6	86.2	21.3	72.4

#### 4.4.0 PAPEL DA RESPOSTA DE *Zea* A MUDANÇAS NO AMBIENTE E A DOMESTICAÇÃO DO MILHO.

O milho é um taxon cultivado do equador até quase 50 graus de latitude, e do nível do mar até 3500 m de altitude. Isso é conseguido com o cultivo de germoplasma adaptado, obtido provavelmente em consequência da grande variabilidade genética presente nos teosintes. Os teosintes, no México e Guatemala, vegetam naturalmente em altitudes médias a altas, e como as evidências acumuladas o credenciam como o provável ancestral do milho, em domesticação recente, é do nosso entendimento que são seus genes para resposta à altitude que hoje se expressam na espécie domesticada. Como o teosinte se distribui numa faixa relativamente estreita de latitude cobrindo apenas áreas do México e Guatemala (Wilkes, 1967), tem-se que aceitar que são também seus genes que conferem adaptação à ampla faixa de latitude em que o milho é cultivado. Essa variabilidade pode ser devida aos genes para a resposta ao fotoperíodo, e principalmente aos genes para resposta a temperaturas das várias altitudes em que o teosinte vegeta. Tais genes foram manipulados pelos indígenas do México, América Central e América do Sul, sendo concentrados de maneira distinta em três a quatro dezenas de raças de milho, que são a base do germoplasma do cereal.

A introdução de representantes do gênero *Zea* em regiões de diferentes altitudes e latitudes para fins de melhoramento, também tem demonstrado que as respostas à altitude e à latitude são

correspondentes, induzindo de forma semelhante o florescimento das plantas. Como mostrou Wellhausen et al. (1952, 1958) e Goldsworthy et al. (1974b), plantas adaptadas a regiões de alta altitude, no México e Guatemala, quando levadas para regiões de baixa altitude, respondem da mesma maneira que plantas adaptadas às altas latitudes (dias longos), quando são levadas para regiões mais próximas do equador (Francis, 1970, citado por Rood & Major, 1980; Spencer, 1975), nessa trajetória tornam-se precoces. Numa trajetória inversa, isto é, quando plantas adaptadas a regiões tropicais de baixa altitude são levadas para alta altitude, na mesma região, ou para locais de latitudes maiores, tornam-se tardias.

O milho e principalmente seus ancestrais, os teosintes, têm seu florescimento afetado pelo fotoperíodo (Wilkes, 1967; Fridman, 1987). Os representantes do gênero *Zea* também são sensíveis à temperatura (Iltis, 1986). E o florescimento do milho também é afetado pela temperatura, como foi demonstrado por Wellhausen et al. (1952, 1958), Goldsworthy & Colegrove (1974a), Goldsworthy et al. (1974b), Bonaparte (1975), Stevenson & Goodman (1972) e Allison & Daynard (1979). Como o milho foi domesticado recentemente (Wilkes, 1979, em citação de Iltis, 1986), e sabendo-se que frequências gênicas distintas diferenciam os tipos selvagens do domesticado (Galinat, 1988), tem-se inevitavelmente que concluir que os locos para resposta à temperatura, condicionando o florescimento no milho são os mesmos que estão presentes no teosinte. Se diferenças ocorrem entre os dois taxa, estas devem ser atribuídas a alterações da frequência gênica, em consequência das seleções natural e artificial.

A diferenciação do tecido meristemático da camada apical, tanto do colmo principal como dos ramos laterais, quando presentes, em tecido reprodutivo é dada pelo número de horas de escuro e/ou por unidades térmicas acumuladas. É tanto assim que as últimas são sugeridas para estimar a época do florescimento do milho por vários pesquisadores, como Wang (1960), Nuttonson (1953) e Holmes & Robertson (1959) (citados por Shaw, 1988). Plantas de regiões temperadas quando levadas em direção ao equador, têm o período noturno aumentado, e num espaço curto de tempo, acumulam o número de horas que aciona o processo de diferenciação dos órgãos reprodutivos. Conseqüentemente, as plantas adaptadas a mais altas latitudes vão ficando cada vez mais precoces quando são levadas para regiões mais próximas do equador. Isso é facilmente deduzido dos trabalhos de Francis (1970), citado por Rood & Major (1980) e Spencer (1975). É também a experiência de todo melhorista que introduz germoplasma de milho temperado em regiões subtropicais ou tropicais. As plantas ficam precoces e interrompem muito cedo o crescimento vegetativo, pela diferenciação dos tecidos meristemáticos em tecidos florais. Conseqüentemente ficam com baixa estatura pela redução do número de nós, reduzem o número de folhas, área foliar e em consequência baixam seu peso seco final. Do mesmo modo, em situação oposta, plantas da região tropical, quando levadas para alta latitude, passam a acumular horas de escuro muito lentamente e atrasam seu florescimento. Com isso crescem demasiadamente e frequentemente nem chegam a florescer em consequência da menor estação de cultivo das regiões temperadas. É essa a experiência de pesquisadores da região temperada ao introduzir germoplasma tropical

para transferência de genes em estoques específicos.

Por outro lado, dentro de uma mesma faixa de latitude, digamos de  $10^{\circ}$  a  $15^{\circ}$ , na região tropical, apesar do fotoperíodo pouco afetar o florescimento das plantas, nessa amplitude pode ocorrer germoplasma com ciclos precoces, médios e tardios, em vários graus, perfeitamente adaptados a essa latitude como mostrou Wellhausen et al. (1952, 1958) estudando raças de milho do México e Guatemala. Foi demonstrado por esses autores que a temperatura é um fator crítico para determinar o florescimento, a arquitetura e a biomassa final dos indivíduos. Em regiões de maior altitude, as plantas seriam mais altas, em consequência de temperaturas mais baixas, que retardariam o florescimento. Por outro lado, em altitudes mais baixas, as plantas se tornariam menores e mais precoces, em função de temperaturas mais altas. Em outros trabalhos foi mostrado também que a temperatura é crítica para induzir a diferenciação dos órgãos reprodutivos, como foi sugerido por Wallace & Bressman (1937) e Rench (1973), citados por Shaw (1988), como também por Goldsworthy et al., 1974b; Bonaparte, 1975; Allison & Daynard, 1979). Os tipos mais precoces diferenciam os tecidos reprodutivos mais cedo, porque são certamente menos exigentes ao número de horas acumuladas de temperaturas que promovem o crescimento do milho. A temperatura mínima que permite o crescimento do milho é geralmente tida como  $10^{\circ}\text{C}$  (Shaw, 1988), e por isso entra nas fórmulas de unidades térmicas, chamadas graus dias, usadas pelas indústrias de sementes e agricultores em geral, nas zonas temperadas, para se estimar as datas de florescimento das cultivares de milho (Brown, 1969; Cross & Zuber, 1972 e Rench, 1973; Eckert & Hicks, 1985,

citados por Shaw, 1988).

Os tipos de ciclo médio e os extremos, tardios, ao contrário dos precoces, necessitam de um número maior de horas de temperatura igual ou maior à  $10^{\circ}\text{C}$  para a indução do processo de florescimento. Isso significa também que uma cultigen, submetida a temperaturas mais baixas, que ocasionalmente podem ocorrer, terá seu florescimento retardado, e conseqüentemente seu ciclo aumentado. Tipos adaptados a altas altitudes, quando levados a regiões mais baixas, tornam-se mais precoces pelo acúmulo rápido de unidades térmicas. Dessa discussão, nota-se que é possível estudar o efeito da redução da altitude no desenvolvimento das plantas de *Zea*, através do efeito correspondente da redução do comprimento do dia. Numa região de 600 m de altitude e aproximadamente  $23^{\circ}$  de latitude, como é o caso da UNICAMP, com temperaturas médias acima de  $10^{\circ}\text{C}$  ao longo do ciclo vegetativo (Tabela 2), tanto em cultivos de dias longos, Outubro a Julho, como em dias curtos, Fevereiro a Julho, tem-se condições apropriadas para simular o efeito de alta e baixa altitudes no florescimento de *Zea*, respectivamente. Foi exatamente essa a estratégia usada para interpretar o efeito da migração do teosinte de regiões montanhosas do México para regiões de menor altitude no seu florescimento e arquitetura, e finalmente a consequência disso no processo de domesticação do milho.

O estudo comparativo dos teosintes das Seções *Zea* e *Luxuriantes*, nas duas condições de fotoperíodo, mostrou no presente trabalho que as plantas migrando de dias longos para dias curtos passam a apresentar as seguintes características:

1- Tornam-se mais precoces, com menor número de nós, menor área foliar e conseqüentemente menor altura, características essas que também ocorrem nas raças de milho adaptadas a regiões de menor altitude, como foi mostrado nos trabalhos de Wellhausen et al. (1952, 1958).

2- As plantas passam a concentrar seus frutos em espigas inseridas no colmo principal, devido à redução do número de perfilhos, o que também ocorre em raças de milho adaptadas a regiões de baixa altitude (Wellhausen et al, 1952), provavelmente em função do aumento de temperatura, como demonstrou Stevenson & Goodman (1972).

3- Na ráquis das inflorescências masculinas há aumento do comprimento das espiguetas, o que certamente implica em melhor eficiência na produção de grãos de pólen.

4- Há redução do período do florescimento, o que implica em maior concentração de pólen e menor amplitude de maturação.

5- Há expressão de dominância apical nos teosintes.

6- Há um aumento significativo da relação peso de grãos/peso de massa vegetativa.

As modificações observadas na expressão fenotípica dos teosintes, quando passam de dias longos para dias curtos, ou quando vegetam em altitudes mais baixas, revelam que os tipos selvagens têm norma de reação mais ampla daquela do tipo domesticado. Outro ponto significativo é que essas alterações apareceram em dias curtos, coincidindo com várias das características que são citadas como resultantes do processo de domesticação de plantas por Harlan et al., (1973), Zeven & de Wet, (1982) e Ashri (1989). Portanto, a

plasticidade fenotípica dos teosintes deve ter contribuído e muito para estimular a sua domesticação, uma vez que em altitudes mais baixas ou de fotoperíodo mais curto, passaram a apresentar características que se expressam nos tipos domesticados. Essas evidências mostram como a plasticidade fenotípica pode atrair a atenção do homem para engatilhar o processo de domesticação, estimulando-o a fazer sucessivas colheitas e plantios, induzindo a seleção automática na fase inicial do processo, o que pelo menos nesse gênero, parece esclarecer a razão porque o teosinte deve ter chamado a atenção do homem.

As variações fenotípicas causadas pelo meio podem ser de caráter adaptativo, como foi sugerido por Stebbins (1974), para servir de ajuste do organismo ao ambiente em que está presente. Parece-nos então, que a migração das sementes das regiões montanhosas para regiões mais baixas ou vales, levou à uma expressão diferenciada do fenótipo das plantas de teosinte, que possivelmente em associação com algumas mutações passaram a ser interessantes ao homem, iniciando assim o processo de domesticação. Uma das características mais importantes dessa plasticidade fenotípica para estimular a domesticação seria a precocidade dos teosintes manifestada em regiões mais baixas, pois é através do florescimento que ocorrem as grandes mudanças no fenótipo. Isso é coerente com o ciclo médio do taxon *Z. mays parviglumis parviglumis*, adaptado a altitudes médias, e que vem sendo sugerido por Doebley (1983, 1984), Doebley et al. (1984, 1987) e Kato (1984), citado por Iltis (1986) como o provável progenitor do milho, com base em dados de isoenzimas e citogenéticos. Dados recentes

obtidos com o emprego de técnicas de biologia molecular dão suporte a essa hipótese (Doebley, 1990b).

Bem ao contrário do que se acreditava anteriormente, sabe-se hoje que os mecanismos de herança de características bastante contrastantes entre milho e teosinte obedecem a um padrão de herança simples ou de poucos genes envolvidos na diferenciação entre o selvagem e o domesticado (Harlan et al., 1973; Galinat, 1988). Progenies de cruzamentos entre milho e a espécie *Z. luxurians* (Silva & Fridman, 1984), retrocruzadas com o parental selvagem forneceram também evidências que um pequeno número de genes separa o milho do seu ancestral selvagem. O retrocruzamento produziu descendência semelhante ao *Z. luxurians*, com espigas de uma fileira de grãos revestidos por cúpulas. De maneira semelhante, ao se proceder o retrocruzamento para o parental domesticado, foram obtidos indivíduos com espigas típicas de milho. Desse modo apenas um ou dois locos poderiam explicar as diferenças entre as inflorescências femininas do milho e dos teosintes. Esses resultados sugerem que mutações simples poderiam ter ocorrido, expondo parcialmente os frutos e soldando as glumas retraídas em suas bases, formando uma ráquis não-fragmentável. Mutações como essas passariam a ser notadas mais facilmente em plantas de teosinte adaptadas a regiões montanhosas que migraram para mais baixas altitudes, e que por isso passaram a apresentar fenótipo com características que despertaram o interesse do homem. Como consequência iniciar-se-iam as pressões de seleção automática inconsciente, que após gerações sucessivas de colheitas e plantios, fariam surgir as síndromes adaptativas características dos tipos

domesticados.

Dessa forma, a nossa hipótese em milho, parece restringir um pouco o princípio sugerido por Harlan et al. (1973) e Zeven & de Wet (1982), segundo o qual as síndromes adaptativas no cultigen teriam surgido em consequência do processo de domesticação. A análise dos atributos morfológicos e da fenologia reprodutiva dos teosintes, discutidos no presente trabalho, sugerem que as alterações fenotípicas do tipo selvagem provocadas pela sua dispersão para menores altitudes, podem muito bem ser causas e não consequências do processo de domesticação.

As mutações que impedem a fragmentação da espiga do teosinte passariam a impedir a sua dispersão natural, tornando o tipo modificado dependente do homem para sua disseminação. A perda do revestimento dos frutos, por sua vez, teria induzido a perda de dormência, uma vez que o revestimento natural dos frutos inibe a pronta germinação das sementes, como foi demonstrado no presente trabalho, e como é sugerido de maneira genérica por Harlan et al. (1973).

A análise das características reprodutivas indicou que o tipo domesticado além de ser mais precoce, também apresenta maior compactação do florescimento e melhor coincidência na maturação das inflorescências masculinas e femininas. Essas alterações teriam surgido em consequência de pressões a que as plantas foram submetidas desde a agricultura primitiva, quando se passou a cultivá-las em alta densidade de plantio. No início da domesticação, as plantas mais precoces, do tipo mazóide, teriam um crescimento mais rápido em

comparação com as mais tardias, do tipo teozóide, resultando no sombreamento das últimas e conseqüentemente atrasando o florescimento das plantas dominadas. Surgiria, em conseqüência, o isolamento reprodutivo, que favoreceria o aumento da frequência de genes para maior precocidade.

A dispersão das sementes da gramínea recém-domesticada feita pelos indígenas para regiões de maior altitude da área subtropical e/ou para áreas de maiores latitude permitiu uma posterior seleção natural e artificial para ciclos vegetativos compatíveis com o local habitado pelo homem. A migração para maiores altitudes e latitudes tornaria as plantas mais tardias, levando o homem a selecionar as mais precoces capazes de produzir grãos nas novas condições de altitude e latitude. Com isso, exercendo uma forte pressão de seleção para precocidade.

Como resultante dessas modificações no ciclo das plantas, objetivando uma maior produtividade em alta densidade de plantio, surgiu a dominância apical para garantir uma rápida e segura produção de grãos, através do desenvolvimento preferencial da espiga mais próxima da panícula. Paralelamente às modificações surgidas na espiga, ocorreram também transformações na inflorescência masculina para garantir uma melhor granação das espigas. Em conseqüência da seleção artificial, houve alongamento da ráquis da panícula e aumento do índice de condensação das espiguetas masculinas, para assegurar uma alta produção de grãos de pólen num período mais curto de florescimento.

#### 4.5. TEORIAS DE GALINAT E ILTIS E O SIGNIFICADO DA PRESENTE CONTRIBUIÇÃO NA ELUCIDAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO MILHO.

As alterações fenotípicas registradas em várias características relacionadas morfofisiologicamente com o processo reprodutivo, expressas em função da dispersão do teosinte de altas para mais baixas altitudes, mostram que o teosinte tem norma de reação bem mais ampla do que a do milho. Essa maior plasticidade fenotípica do tipo selvagem em relação ao domesticado, traduzida em mudanças que poderiam tornar o teosinte passível de ser domesticado, é ao nosso ver, uma característica fundamental no processo de sua domesticação. Esse aspecto, ignorado por Galinat (1971, 1978, 1983) e por Iltis (1986), curiosamente, dá evidências importantes para apoiar aspectos considerados, tanto em uma como em outra teoria.

Galinat (1988) por exemplo diz que na primeira fase da domesticação, houve seleção inconsciente em teosinte que acabou concorrendo para a formação de agregados de espigas, cuja função principal foi a de reter os frutos desarticulados. Esse ponto, tanto aqui como em outras espécies, é sempre nebuloso porque implica que o homem decidiu domesticar uma espécie selvagem, praticamente sem nenhum atrativo especial. O teosinte, em nenhuma ocasião tem permitido aos pesquisadores, geneticistas, botânicos, arqueólogos, antropólogos ou historiadores, qualquer sugestão de ter sido planta de interesse do homem, mesmo hoje, com o incentivo à procura de forrageiras para a alimentação de animais. A distribuição das espigas pequenas e

fragmentáveis, com 4 a 12 grãos, revestidos por uma cúpula extremamente dura, em nós de ramos laterais e perfilhos, desde a base até as proximidades das panículas terminais, sugere, mesmo aos mais experientes, uma grande dificuldade para ser explorado economicamente como produtor de grãos. As mudanças morfológicas aqui mostradas, de fotoperíodo longo para curto, correspondendo à mudança de alta para mais baixa altitude, dão evidências que foram por Galinat (1988) incorretamente atribuídas a síndromes adaptativas em decorrência da seleção inconsciente. Pois, as plantas, com a migração natural montanha abaixo, com aumento das unidades térmicas, teriam reduzido o número de perfilhos, encurtado os nós tanto do colmo como dos ramos laterais, acarretando numa diminuição do número de espigas produzidas por planta, reduzindo o seu tamanho, o seu peso, o seu número de folhas, aumentando o tamanho das espiguetas masculinas da panícula terminal, comprimindo também os ciclos vegetativo e reprodutivo, e finalmente elevando a relação grão/massa da planta. Há evidências também que a dominância apical começa a se expressar com essas mudanças no regime de luz. A expressão do novo teosinte em regiões mais baixas, já com o fenótipo mais parecido com a espécie em processo de domesticação, por si só pode ter estimulado início da seleção artificial. Obviamente "mutações chave", como as sugeridas por Galinat (1988) acelerariam o processo pela visualização do produto principal, o grão, em frutos deiscentes em hastes não-fragmentáveis. Esses novos conhecimentos fornecem novos elementos à teoria de Galinat, mostrando como o homem passou a ter interesse pelo teosinte, para iniciar o processo de domesticação, tornando mais factível a execução da seleção

automática.

Por outro lado, na teoria de Iltis é obscura a natureza do fator que acionou a TSC nos teosintes. O autor sugere que causas como erupções vulcânicas, ou queda da temperatura por um período de alguns anos, ou ataques de fungos, como *Ustilago zea*, teriam produzido alterações fisiológicas, ativando células que causam a reativação do ovário abortado nas inflorescências masculinas. Esses efeitos poderiam ter estimulado a TSC. Também não fica afastada por Iltis (1986) a ocorrência de mutações causando a feminização das flores masculinas nas panículas dos ramos laterais de teosinte. Essa mudança de sexo, associada à condensação tanto da espiga, como do ramo lateral, teriam atraído a atenção do homem para iniciar a seleção consciente que culminaria com a compactação do pedúnculo, e conseqüentemente das folhas (brácteas) e multiplicação do número de fileiras. A modificação morfológica unidirecional a translocação de nutrientes para a concentrada fonte de consumo principal, primeira espiga, inibindo como conseqüência fontes de consumo secundárias, as espigas inferiores. Iltis, baseia todos os seus argumentos na homologia incontestada dos ramos laterais do teosinte e as espigas polísticas do milho. Conseqüentemente, o ramo lateral, morfológica e fisiologicamente, passou a ser o principal ponto de atenção de Iltis. Esse autor diz que em condições naturais, os teosintes pouco perfilham e que nessas condições dariam oportunidade para um menor auto-sombreamento que estimularia o desenvolvimento dos ramos laterais (Iltis, 1986). Já em condições de mais alta latitude, com fotoperíodo mais longo, produz um grande número de perfilhos, como por exemplo no verão da Flórida e de

Massachussets (Wilkes, 1967), que acabariam inibindo a formação de ramos laterais nas várias hastes. Daí Iltis ter sugerido que o ambiente do México, com fotoperíodo de região subtropical, é propício para que os teosintes mostrem seus ramos laterais que seriam oportunamente transformados em espigas de milho pela TSC.

A nossa interpretação difere um pouco da apresentada por Iltis (1986), tanto em relação às possíveis causas que teriam levado à TSC, como às causas que fazem os teosintes perfilharem menos nas regiões em que foram observados no México e na Guatemala. Nossas observações indicam que o colmo único em plantas de teosinte, como observou Iltis na Guatemala, já pode ser consequência do efeito de unidades térmicas acumuladas mais rapidamente em altitudes mais baixas de teosintes adaptados a mais altas altitudes. Iltis (1986) critica Galinat em suas idéias sobre a seleção inconsciente aplicada em teosinte, dizendo que isso não é necessário, uma vez que em populações naturais de teosinte é comum ocorrerem plantas que apresentam colmo único, sem ramificações laterais e com espigas reunidas em fascículos, que poderiam, à primeira vista, serem consideradas produtos de seleção artificial. A nossa explicação para a variação no perfilhamento, é que plantas de teosintes adaptadas à alta altitude têm genótipo mais exigente para unidades térmicas, e assim sendo respondem mais facilmente aos aumentos de temperatura das regiões mais baixas. Consequentemente ficam mais precoces e revelam as demais características mencionadas. Essas rápidas mudanças fenotípicas, em consequência da dispersão dos teosintes para regiões mais baixas, substituiriam em grande parte as modificações pretendidas por Iltis na

TSC, cuja origem tem sido explicada de forma pouco convincente, como já vimos. Mutações simples ativando o ovário, que é abortado em espiguetas masculinas das panículas terminais dos ramos laterais, também não afastadas por Iltis, ao nosso ver, poderiam muito bem ter dado a partida para o início do processo de domesticação.

Outro ponto importante, sugerido por vários autores, Randolph (1959) e McClintock (1959), citados por Galinat (1988) e Mangelsdorf (1974), é que a domesticação do milho poderia ter ocorrido em regiões geográficas diferentes, e de forma independente. Além disso, Iltis (1986) tem sugerido vales ou sopés de montanhas com solos mais férteis, ricos em calcário, como locais mais apropriados para a ocorrência da domesticação. Essas sugestões são compatíveis com as observações do presente trabalho, que indicam que os teosintes apresentam expressão fenotípica mais favorável para a domesticação em regiões mais baixas, do que aquelas em que são adaptados.

## 5. CONCLUSÕES.

Os seguintes pontos podem ser considerados:

1. Características da reprodução, principalmente aquelas que são função da época de florescimento dos estames e dos pistilos, foram as que apresentaram o maior poder discriminante para separar os taxa dentro de *Zea*. Sua importância é realçada quando se constata que elas são as mesmas que promovem o isolamento reprodutivo entre os taxa selvagens, bem como entre estes e o tipo domesticado.

2. Esses atributos permitem a separação de 4 grupos distintos dentro do gênero *Zea*. Um formado pelo tipo domesticado, *Zea mays mays*. Outro, pelos teosintes anuais mexicanos, *Z. mays mexicana*. Um terceiro, pelos teosintes *Z. diploperennis* e *Z. luxurians*, e finalmente o último pelo *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*, o que sugere a necessidade de revisões na classificação de Doebley & Iltis (1980).

3. Embora grandes modificações tenham se processado, tanto morfológica quanto fisiologicamente, a taxa de cruzamento permaneceu inalterada nos vários taxa estudados. Isso mostra que essa característica, de alto valor adaptativo, foi resistente a mudanças em *Zea*, apesar da seleção artificial imposta na domesticação e à intensa pressão de seleção a que tem sido submetido o milho em programas de melhoramento.

4. A norma de reação expressa em 14 das 20 características estudadas, no tipo selvagem, foi bem mais ampla do que a do tipo domesticado. A norma de reação expressa nos teosintes em consequência da sua migração de regiões de alta altitude para mais baixa altitude, teria a nosso ver deflagrado o processo de domesticação.

5. A indução precoce do florescimento através do aumento da temperatura alterou a arquitetura das plantas dos teosintes adaptados a altitudes maiores, quando estes passaram a crescer em regiões mais baixas, fazendo com que as plantas passassem a expressar características morfofisiológicas típicas de vegetais que já estão em processo de domesticação. Essas alterações teriam estimulado o homem a praticar seleção na espécie selvagem, visando a sua domesticação. Essa hipótese é aqui formulada para explicar a rápida domesticação do milho a partir de seu provável ancestral selvagem, o teosinte.

6. Esse estudo finalmente mostra como um mecanismo genético-fisiológico pode contribuir para esclarecer um ponto que sempre foi nebuloso na domesticação de plantas, ou seja, o que levaria o homem a se interessar por uma espécie selvagem para domesticá-la, impondo à mesma o que tem sido chamado de seleção automática inconsciente. Os conhecimentos apresentados, pelo menos nesse exemplo, mostram como certas alterações fenotípicas no tipo selvagem, em consequência de sua ampla norma de reação podem estimular o homem a impor seleção inconsciente iniciando o processo de domesticação.

## 6. RESUMO.

Representantes selvagens, teosintes, e o tipo domesticado, milho, do gênero *Zea*, foram cultivados sob dias curtos e longos na Área Experimental da UNICAMP (SP) a 22° e 54' latitude sul, nos períodos de Fevereiro a Julho de 1989 e de Outubro de 1989 a Julho de 1990, na expectativa de produzir efeitos semelhantes aos provocados pela migração desses representantes de mais alta para mais baixa altitude.

Os teosintes estudados foram *Zea mays mexicana* (raças Central Plateau e Chalco Los Reyes), *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*, pertencentes à Seção *Zea*, e *Z. diploperennis* e *Z. luxurians*, que compõem a Seção Luxuriantes. O milho, *Z. mays mays*, foi representado pela população mazóide I-8, sintetizada em nosso laboratório.

Dentre as 20 variáveis analisadas, as características reprodutivas foram as mais importantes na discriminação dos taxa estudados, distribuindo-os em 4 grupos distintos. Um formado pelo milho, *Zea mays mays*. Outro pelos teosintes anuais mexicanos, *Z. mays mexicana*. Um terceiro pelas espécies *Z. diploperennis* e *Z. luxurians*, e por fim um formado pelo *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*. Essa distribuição aponta a necessidade de uma reformulação da classificação de Doebley & Iltis (1980).

A manutenção da taxa de cruzamento, próximo à unidade, em todos os representantes do gênero *Zea* sugere que esse carácter de alto valor adaptativo resistiu às pressões de seleção sofridas tanto no decorrer do processo de domesticação, como nos programas de melhoramento intensamente aplicados ao milho.

A maior plasticidade fenotípica, em consequência da norma de reação ampla dos tipos selvagens, manifestada em 14 das 20 características analisadas, parece ter tido um papel importante durante a migração dos teosintes para regiões mais baixas. Nessa trajetória, temperaturas mais altas teriam induzido o florescimento precoce dos teosintes adaptados a maiores altitudes, alterando a arquitetura das plantas e tornando-as mais atraentes para serem domesticadas. Essa mudança instantânea acrescida de algumas modificações nas espigas dos teosintes expondo os frutos e mantendo-os presos em estrutura não-fragmentável, teriam permitido a rápida domesticação do milho, a partir do teosinte. As observações aqui coletadas mostram como a dispersão dos tipos selvagens pode, no novo meio, induzir alterações morfofisiológicas nas plantas que passaram a motivar o homem a iniciar o processo de seleção inconsciente, deflagrando o processo de domesticação.

## 7. SUMMARY.

The wild types, teosinte, and the domesticated corn of *Zea* were grown under long and short days at 22° and 54' South at Campinas, SP - Brazil in an attempt to simulate corresponding effects induced by dispersion of wild representatives from higher to lower altitude.

The following germplasm was studied from Section *Zea*: *Z. mays mexicana* represented by the races Central Plateau and Chalco Los Reyes; *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis* e *Z. mays mays* represented respectively by a population and a corn synthetic named mazoide - 18. From Section *Luxuriantes* two populations were used representing *Z. diploperennis* and *Z. luxurians*.

Among 20 variables evaluated in a plant, the reproductive traits involving the flowering period of male and female inflorescences, were the ones that showed the highest discriminant power, separating the taxa in four distinct groups. One represented by *Z. mays mays*, a second by *Z. mays mexicana*, a third by both *Z. luxurians* and *Z. diploperennis* and the last by *Z. mays parviglumis huehuetenanguensis*. This distribution points out the need for a revision in the classification of *Zea* of Doebley & Iltis (1980).

The constant outcrossing rate found in all wild taxa and in the domesticated taxon indicates that this highly adaptative trait has been resistant to changes despite the selection pressure imposed by man on the wild ancestor, during domestication, and in subsequent

maize breeding programs.

The wider norm of reaction shown in 14 of the 20 traits of teosinte appears to have played an important role during dispersion of the wild types toward lower altitude. Higher temperatures would have induced early flowering in teosinte adapted to higher altitude, producing plants with more suitable architecture to attract man to start the process of domestication. These instant changes in the teosinte complemented by female spike modifications exposing the fruits in a nonfragmented structure, would have triggered the rapid domestication of corn.

Our data show how dispersion of wild representatives to a new environment can induce morphophysiological changes in the plants, due to their wider norm of reaction for flowering, stimulating man to start automatic selection leading to domestication.

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

- ALLISON, J.C.S. & DAYNARD, T.B. Effect of change in time of flowering, induced by altering photoperiod or temperature, on attributes related to yield in maize. *Crop Science*, 19:1-4. 1979.
- ASHRI, A. Major gene mutations and domestication of plants. In: *Plant domestication by induced mutations*. Vienna Tech. Publ., Vienna, p.3-5. 1989.
- BEADLE, G.W. The ancestry of corn. *Scientific American*, 242:96-103. 1980.
- BONAPARTE, E.E.N.A. The effects of temperature, daylength, soil fertility and soil moisture on leaf number and duration to tassel emergence in *Zea mays* L. *Annals of Botany*, 39:853-61. 1975.
- BROWN, A.D.H. & ALLARD, R.W. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. *Genetics*, 66:133-45. 1970.
- CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. *BioScience*, 30(12):814-18. 1980.

DE WET, J.M.J. & HARLAN, J.R. Origin of maize: the tripartite hypothesis. *Euphytica*, 21:271-79. 1972.

DOEBLEY, J.F. Molecular evidence for a missing wild relative of maize and the introgression of its chloroplast genome into *Zea perennis*. *Evolution*, 43(7):1555-59. 1989.

———. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. *BioScience*, 40(6):443-48. 1990a.

———. Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). *Maydica*, 35:143-50. 1990b.

——— & ILTIS, H.H. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa. *American Journal of Botany*, 67(6):982-93. 1980.

———, GOODMAN, M.M., STUBER, C.W. Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae). *Systematic Botany*, 9(2):203-18. 1984.

FRANKEL, R. & GALUN, E. Introduction. In: ——— & ———. *Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding*. Berlin, Springer-Verlag, c1977. v.2, Cap.1, p.1-50.

FRIDMAN, J.J. Fotoperiodismo e competição de grão de pólen como mecanismos de isolamento genético entre milho e teosinte. Campinas, 1987. 91p. (Dissertação - Mestrado em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas).

FRIEND, D.J.C. Tillering and leaf production in wheat as affected by temperature and light intensity. *Canadian Journal of Botany*, 43:1063-76. 1965.

GALINAT, W.C. The origin of maize. *Annual Review of Genetics*, 5:447-78. 1971.

———. The origin of maize as shown by key morphological traits of its ancestor. *Maydica*, 28:121-38. 1983.

———. The missing links between teosinte and maize: a review. *Maydica*, 30:137-60. 1985.

———. The origin of corn. In: SPRAGUE, G.F. & DUDLEY, J.W. (ed.). *Corn and corn improvement*, third edition, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America Inc., Publishers. Madison, Wisconsin, 1988. Cap.1, p.3-27.

GOLDSWORTHY, P.R. & COLEGROVE, M. Growth and yield of highland maize in Mexico. *Journal of Agricultural Science*, 83:213-21. 1974a.

———, PALMER, A.F.E., SPERLING, D.W. Growth and yield of lowland tropical maize in Mexico. *Journal of Agricultural Science*, 83:223-30. 1974b.

GOODMAN, M.M. História e origem do milho. In: PATERNIANI, E. & VIÉGAS, G.P. (ed.). *Melhoramento e produção do milho*, Fundação Cargill, Campinas, SP. 1987. v.1, Cap.1, p.1-24.

GOULD, S.J. A short way to corn. *Natural History*, 93(3):12-20. 1984.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany*, 69:1685-93. 1982.

——— & ALLARD, R.W. Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 69:2100-104. 1972.

HARLAN, J.R. Agricultural origins: centers and noncenters. *Science*, 174:468-73. 1971.

- . Crops and man. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, 1975c. 295p.
- , DE WET, J.M.J., GLEN PRICE, E. Comparative evolution of cereals. *Evolution*, 27:311-25. 1973.
- ILTIS, H.H. From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. *Science*, 222:886-94. 1983a.
- . The catastrophic sexual transmutation theory (CSTD): From teosinte tassel spike to the ear of corn. *Maize Genetics Cooperative Newsletter*, 57:81-91. 1983b.
- . Maize evolution and agricultural origins. In: SODERSTROM, T.R. et al. ed. *Grass systematics and evolution: An International Symposium Held at the Smithsonian Institution, Washington, 1986.* Washington, Smithsonian Institution Press, 1987. Cap.19, p.195-213.
- KAHLER, A.L., GARDNER, C.D. , ALLARD, R.W. Nonrandom mating in experimental populations of maize. *Crop Science*, 24:350-54. 1984.
- LANGHAM, D.G. The inheritance of intergeneric differences in *Zea-Euchlaena* hybrids. *Genetics*, 25:88-107. 1940.

MANGELSDORF, P.C. Teosinte the closest relative of maize and The genetic nature of teosinte. In: ——— . Corn, its origin, evolution and improvement. Cambridge, MA, Belknap Press, Harvard University Press, 1974. Caps.3-4, p15-52.

———. The origin of corn. Scientific American (August):72-8. 1986.

MASTENBROEK, I., COHEN, C.E., DE WET, J.M.J. Seed protein and seedling isozyme patterns of *Zea mays* and its closest relatives. Biochemistry, Systematic and Ecology, 9(2/3):179-83. 1981.

MONTEIRO, A.M. & SHARIF, R.R. Fotoperíodo e correlação dos principais eventos do desenvolvimento de milho. Revista Brasileira de Botânica, 8:163-8. 1985.

NEI, M. & SIAKUDO, K. The estimation of outcrossing in natural populations. The Japanese Journal of Genetics, 33:46-51. 1958.

PATERNIANI, E. Evolução do milho e implicações no melhoramento. In: COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., Piracicaba, SP, 1984. Anais... Ribeirão Preto, SP, Sociedade Brasileira de Genética, 1985. p.235-9.

RANDOLPH, L.F. Contributions of wild relatives of maize to the evolutionary history of domesticated maize: a synthesis of divergent hypothesis I. *Economic Botany*, 30:321-45. 1976. ROOD, S.D. &

ROOD, S.D. & MAJOR, D.J. Responses of early corn inbreds to photoperiod. *Crop Science*, 20:679-82. 1980.

ROGERS, J.S. The inheritance of photoperiodic response and tillering in maize-teosinte hybrids. *Genetics*, 35:513-40. 1950.

RUSSEL, W.K. & STUBER, C.W. Effects of photoperiod and temperatures on the duration of vegetative growth in maize. *Crop Science*, 23:847-50. 1983a.

—— & —— . Inheritance of photosensitivity in maize. *Crop Science*, 23:935-9. 1983b.

SHAW, D.V. & ALLARD, R.W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 62:113-20. 1982.

SHAW, R.H. Climate requirement. In: SPRAGUE, G.F. & DUDLEY, J.W. (ed.). Corn and corn improvement, third edition, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America Inc., Publishers. Madison, Wisconsin, 1988. Cap.10, p.609-33.

SHORROCKS, B. A origem da diversidade, as bases genéticas da evolução. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978. 181p.

SILVA, W.J. & FRIDMAN, J.J. Aspectos evolutivos da tribo Maydeae. Hipóteses sobre a domesticação do milho. In: COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., Piracicaba, SP, 1984. Anais... Ribeirão Preto, SP, Sociedade Brasileira de Genética, 1985. p.203-13.

SMITH, J.S.C., GOODMAN, M.M. , LESTER, R.N. Variation within teosinte. I. Numerical analysis of morphological data. Economic Botany, 35(2):187-203. 1981.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, KATO Y., T.A. Variation within teosinte. II. Numerical analysis of chromosome knob data. Economic Botany, 36(1):100-12. 1982.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, STUBER, C.W. Variation within teosinte. III. Numerical analysis of allozyme data. *Economic Botany*, 38(1):97-113. 1984.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Relationships between maize and teosinte of Mexico and Guatemala: numerical analysis of allozyme data. *Economic Botany*, 39(1):12-24. 1985.

SPENCER, J. Implications of photoperiod insensitivity in maize (*Zea mays* L.). Services Technical Communication, Department of Agricultural Technical of South Africa, (132):56-68. 1975.

STEBBINS, G.L. Processos de evolução orgânica. Editora da Universidade de São Paulo e Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, GB, 1974. 259p.

STEVESON, J.C. & GOODMAN, M.M. Ecology of exotic races of maize. I. Leaf number and tillering of 16 races under four temperatures and two photoperiods. *Crop Science*, 12:864-68.

STUBER, C.W., WENDEL, J.F., GOODMAN, M.M., SMITH, J.S.C. Techniques and scoring procedures for starch gel eletroforesis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Raleigh, NC, North Carolina Agricultural Research Service, State University, 1988. 87p. (Technical Bulletin 286).

SUN, M. & GANDERS, F.R. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. *Heredity*, 64:139-43. 1990.

THIMOTHY, D.H., LEVINGS III, C.S., PRING, D.R., CONDE, M.F., KERMICLE, J.L. Organelle DNA variation and systematic relationships in the genus *Zea*: Teosinte. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 76(9):4220-4. 1979.

WELLHAUSEN E.J., ROBERTS, L.M., HERNANDES, X.E., MANGELSDORF, P.C. Races of maize in Mexico. The Bussey Institution of Harvard University. 1952. 223p.

———, FUENTES, O.A., CORZO, A.H., MANGELSDORF, P.C. Razas de maiz en la America Central. Folleto Tecnico n°31, Sec. Agric. y Ganaderia. Ofic. Est. Especiales-Mexico. 1958. 138p.

WILKES, H.G. Teosinte: the closest relative of maize. Cambridge, MA, 1967. 159p. (Doctor of Philosophy Thesis - Department of Biology, Harvard University).

ZEVEN, A.C. & DE WET, J.M.J. Origins of agriculture and domestication of plants. In: *Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity*. PUDOC, Wageningen. 1982.