



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 32

**As Expansões do Milho – ZEA
MAYS MAYS, L. - para a
américa do sul, baseado no
resgate e estudo de DNA ancião
de amostras arqueológicas**

Fábio de Oliveira Freitas

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
 Marcos Rodrigues de Faria
 Marta Aguiar Sabo Mendes
 Sueli Correa Marques de Mello
 Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Edson Junqueira Leite
 José Roberto de Alencar Moreira
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva
Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Freitas, Fábio de Oliveira.

As Expansões do Milho – *Zea mays*, L. - para a América do Sul, baseado no resgate e estudo de DNA ancião de amostras arqueológicas / Fábio de Oliveira Freitas. - Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

20 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 32)

1. Milho - DNA - Amostra arqueológica. 2. Milho - Genética.
3. Milho - Amostra arqueológica - América do sul. 4. *Zea mays*
I.Título II. Série.

581.35 CDD - Ed. 21

© Embrapa 2002

Sumário

Introdução	5
Materiais e Métodos	7
Resultados	10
Evolução dos microssatélites	11
Expansão recente de populações de milho	13
Discussão	13
Conclusão	15
Considerações Finais	17
Agradecimentos	17
Referências Bibliográficas	18

As Expansões do Milho – *ZEA MAYS MAYS*, L. - para a América do Sul, baseado no resgate e estudo de DNA ancião de amostras arqueológicas

Fábio de Oliveira Freitas¹

Introdução

O milho (*Zea mays mays* L.) é a principal espécie de planta domesticada no Novo Mundo, aparecendo nos registros arqueológicos primeiramente na América Central por volta de 7.500 anos A.P., e na América do Sul aparecendo mais tarde, em torno de 4.500 anos A.P., na costa do Peru (Goloubinoff et al, 1993). Ela representa uma das mais enigmáticas espécies domesticadas usadas na agricultura de hoje, originada a partir de uma ou mais espécies de teosinte (*Zea mays parviglumis* e *Zea mays mexicana*).

Em termos de arquitetura da planta, milho e teosinte são totalmente diferentes (Dobley et al, 1997). A profunda diferença fenotípica entre milho e teosinte implica em uma divergência genética substancial entre as duas espécies, entretanto, a variação interespecífica observada é, de fato, não maior do que a variação intraespecífica existente dentro do milho (Dobley, 1990). Tal diferença no fenótipo pode ser explicado por um efeito fundador na evolução do milho, resultado de um efeito tipo gargalo de garrafa "bottleneck", seguido por uma intensa seleção artificial (Tankslet & McCouch, 1997).

A erosão genética que deveria estar associado a este processo não é evidente em locus genéticos que possuem uma evolução neutra, como o locus *Adh1*, o qual mostra que o milho possui mais ou menos 75% da diversidade genética

¹ Eng. Agr., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: fabiof@cenargen.embrapa.br

observada em *Zea mays parviglumis* (Eyre-Walker et al, 1998). Análises de isoenzimas em raças de milho Northern Flint, sugerem que esta diversidade pode ser o resultado de uma elevada taxa evolutiva do milho desde a sua domesticação (Doebly et al, 1986)

Um exame na diversidade genética através de fragmentos de DNA preservados em amostras arqueológicas da América do Sul, usando espigas com idades variando entre 400 a 4.500 anos, mostrou que uma idêntica quantidade de diversidade estava presente nestes momentos do passado, assim como estão no presente. Isto implica que não houve um aumento na diversidade genética ao longo do tempo, como seria esperado para populações que estivessem sob uma elevada taxa evolutiva, segundo Goloubinoff et al (1993).

Goloubinoff et al (1993) sugerem que o milho moderno é o resultado da domesticação de diversos genomas do teosinte. Isto pode ter ocorrido através de múltiplos eventos de domesticação; ou por um único evento de domesticação seguido por repetidas introgressões com espécies de teosintes; ou pela domesticação a partir de uma população de teosinte bem diversificada.

Variedade de cultivares primitivos são comumente as progênes diretas das primeiras plantas domesticadas crescidas em uma região, representando a expansão inicial agrícola da espécie. Conseqüentemente, a caracterização biogeográfica de alelos de variedade tradicionais - "landraces" primitivas, pode ajudar a elucidar a evolução das plantas domesticadas (Allaby & Brown, 2001).

Neste estudo, investigamos amostras arqueológicas de milho (Fig. 1) encontradas em cavernas do Vale do Peruaçu, em Januária, Minas Gerais. Os sítios arqueológicos do Vale do Peruaçu são atípicos para uma região tropical, devido a excelente preservação de material vegetal (Junqueira e Malta, 1981/1982; Veloso e Resende, 1992), o que pode ser em parte explicado pela incorporação de minerais do calcário das cavernas nas amostras, fazendo com que o pH delas aumentasse, ajudando na conservação destas (Freitas & Martins, 2000). Adicionalmente, também foram utilizadas nas análises variedade tradicionais primitivas de milho cultivadas por populações indígenas da América do Sul.

Foto: Fábio de Oliveira Freitas



Fig. 1. Duas espigas de milho arqueológicas encontradas durante as escavações na Lapa do Boquete, com idade de 1010 ± 40 anos (Amostras não analisadas geneticamente no presente trabalho). As duas amostras estavam no mesmo silo, mas morfologicamente são muito distintas, tanto na coloração, como no arranjo das sementes na espiga, indicando que as populações daquela época manejavam variedades distintas, ao mesmo tempo.

Material e Métodos

As variedades tradicionais foram obtidas de diferentes tribos indígenas e agricultores tradicionais do Brasil e Paraguai, apresentada na Tabela I. O material arqueológico foi obtido de silos encontrados nas cavernas Lapa do Boquete (Fig. 2); Lapa do Caboclo e Lapa da Hora, no Vale do Peruaçu, distrito de Januária, MG. A idade das amostras arqueológicas analisadas varia entre 570 ± 60 para a mais recente e 940 ± 60 para as mais antigas, com outras amostras com idade intermediárias, tendo sido obtidas usando-se a técnica de datação radiocarbônica (Pessenda e Camargo, 1991).

As amostras A2, A8 e A23 são grãos de milho; as A3, A6 e A34 são espigas e a A5 é palha de milho. Os pares amostrais A2 e A8, além das A5 e A6 foram obtidos de um mesmo silo, respectivamente.

Tabela I. Na tabela é apresentado as amostras que foram utilizadas nas análises; origem e localização delas; idade e tipo de alelos da região da sequência do microsatélite encontrado.

Sigla	Variedade	Fonte*	Localização	Idade	Referência	Alelo
E1	Wuara	indígena	Brasil-MT	Moderno	Este estudo	GA _n TA
E5	Moroti	BG 7Lagoas	Brasil-PR	Moderno	Este estudo	GA ₁ AA ₁ GA _n
E6	Cateto	BG 7Lagoas	Brasil-MA	Moderno	Este estudo	GA _n TA
E9	Cristal	BG 7Lagoas	Brasil-BA	Moderno	Este estudo	GA _n TA; GA ₁ AA ₁ GA _n
E11	Moroti- Guapi	BG 7Lagoas	Paraguai	Moderno	Este estudo	GA _n
E12	Guarani	BG 7Lagoas	Brasil-SP	Moderno	Este estudo	GA _n TA
E13	Cristal	BG 7Lagoas	Brasil-MG	Moderno	Este estudo	GA ₁ AA ₁ GA _n
E14	Caingang	BG 7Lagoas	Brasil-SP	Moderno	Este estudo	GA _n TA; GA ₁ AA ₁ GA _n
E15	Cateto	BG 7Lagoas	Brasil-BA	Moderno	Este estudo	GA _n TA; GA ₁ AA ₁ GA _n
E21	Cateto	BG 7Lagoas	Brasil-SP	Moderno	Este estudo	GA _n TA
E23	Xavante	indígena	Brasil-MT	Moderno	Este estudo	GA _n TA
A2	-	Boquete	Januaria-MG	570 ± 60	Este estudo	GA ₁ AA ₁ GA _n
A3	-	Boquete	Januaria-MG	890 ± 50	Este estudo	GA _n TA
A5	-	Lapa Hora	Januaria-MG	630 ± 60	Este estudo	GA _n TA
A6	-	Lapa Hora	Januaria-MG	630 ± 60	Este estudo	GA _n TA
A8	-	Boquete	Januaria-MG	570 ± 60	Este estudo	GA ₁ AA ₁ GA _n
A23	-	Boquete	Januaria-MG	940 ± 60	Este estudo	GA _n TA
A34	-	Caboclo	Januaria-MG	-	Este estudo	GA _n TA
G1	Northern Flint	USDA213760	USA	Moderno	1	GA _n ; GA _n TA
GBF	Barkeley Fast	Freeling	USA	Moderno	1	GA ₁ AA ₁ GA _n
G3	Conflite Morocho	Bonavia	Peru	Moderno	1	GA _n TA
G4	Tabloncillo	USDA2835	México	Moderno	1	GA _n TA
G5	Kculli-47	Bonavia	Peru	Moderno	1	GA _n
G6	-	Hastorf	Peru	440 ± 40	1	GA _n
G7	-	Tenney	Chile	1500 ± 50	1	GA _n ; GA _n TA

Continua...

Continuação da Tabela I.

G8	-	Bonavia	Peru	4500 ± 500	1	GA _n
G9	<i>Z.mays mexicana</i>	NS/SZ121	Mexico	Moderno	1	GA _n ; GA _n TA
G10	<i>Z.mays parviglumis</i>	Dobley GB	Mexico	Moderno	1	GA _n ; GA _n TA
G11	<i>Z. diploperenis</i>	NS/SZ120	Mexico	Moderno	1	GA _n
G12	<i>Z.luxurians</i>	Dobley HIG5	Guatemala	Moderno	1	GA _n
GTP	<i>Tripsacum pilosum</i>	Dobley JD467	-	Moderno	1	GA _n AA ₁ CA ₁
DBF	<i>Barkeley Flint</i>	-		Moderno	2	GA ₁ AA ₁ GA _n

(¹) Banco de Germoplasma de milho da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG);

(²) Goloumbinoff et al, 1993; 2 – Dennis et al, 1985.

Foto: Fábio de Oliveira Freitas



Fig. 2. Vista geral do sítio arqueológico Lapa do Boquete, no Vale do Peruaçu, onde uma grande quantidade de silos contendo restos vegetais foram encontrados.

Os ácidos nucleicos foram obtidos baseados na técnica da extração por CTAB com uma purificação secundária (Allaby et al, 1997). Uma região alvo de 203 pb do gene *Adh2* foi amplificado por PCR (Fig. 1), usando os seguintes primers: “upstream” [5’ CTGTGG ATCCTCTCGTGTTCTTGGAGTGGT 3’], e “downstream” [5’ CTGTGGATCCTGCGGCT AGAGAGATGCAGCA 3’]. Os parâmetros utilizados nos ciclos do PCR foram: 93,5°C - 2min30s; 60°C - 1min, 74°C - 1min, 93,5°C - 1min (40 ciclos); 60°C - 1min, 74°C - 8min. Os seguimentos amplificados foram restritos com *Bam*HI, clonados no vírus M13mp18 e sequenciados usando-se o sequenciador de DNA ABI 377. Em seguida as seqüências foram alinhadas usando-se CLUSTAL w (Thompson et al, 1993) e ajustadas a olho. Múltiplas seqüências foram obtidas de cada amostra para que fosse possível identificar e remover erros de polimerase ou modificações de bases em potencial, no caso de DNA antigo. Seqüências foram comparadas usando-se a técnica de network (Allaby & Brown, 2001). Cálculo de *r* foi feito de acordo com Forster et al (1996).

Resultados

Estudos anteriores mostraram que o locus *Adh2* é adequadamente polimórfico para estudos evolutivos em milho (Goloubinoff et al, 1993). A região alvo de 203 pb do gene *Adh2* engloba um dinucleotídeo repeat microssatélite (Fig. 3), o qual foi usado na análise evolutiva do milho na América do Sul. Trinta e cinco seqüências, representando dezesseis diferentes alelos foram obtidos das raças tradicionais primitivas. As condições encontradas nas cavernas do Vale do Peruaçu parecem ter contribuído para a preservação de ácidos nucleicos, pois vinte e sete seqüências, representando dez diferentes alelos foram obtidos das amostras arqueológicas. Junto com dados de seqüências já publicados na literatura (Dennis et al, 1985; Goloubinoff et al, 1993), todos os alelos foram alinhados (Freitas, 2001; Freitas et al- no prelo). Como características conflitantes ocorrem na família de multigenes da desidrogenase alcoólica, devido a freqüentes eventos de recombinações genéticas, as seqüências dos alelos do gene *Adh2* foram analisadas utilizando-se a técnica do network de Allaby & Brown (2001), mostrados em Freitas (2001) e Freitas et al(no prelo).

Foto: Fábio de Oliveira Freitas

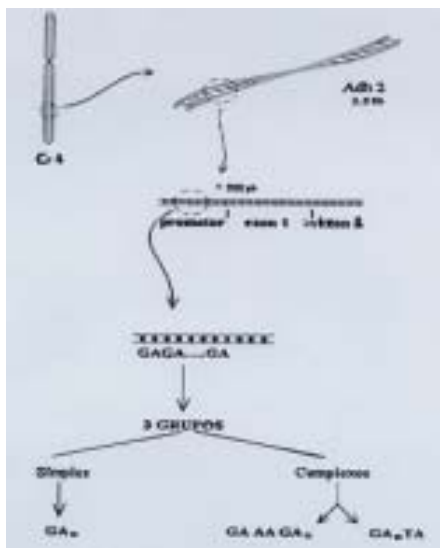


Fig. 3. Esquema mostra a localização do gene *Adh2*, utilizado como alvo no estudo e porção deste usada na análise. Na porção amplificada do gene há a presença de um microsatélite, o qual, além de apresentar uma diversidade de tamanho (número de repetições do dímero), apresentou três diferentes tipos ou grupos de alelos, o tipo simples GA_n , e dois tipos complexos, GA_nTA e $GA_1AA_1GA_n$. Esta variabilidade de tipos de microsatélites possuem uma distribuição geográfica distinta entre as diferentes amostras analisadas, principalmente em termos de América do Sul. Maiores detalhes no texto e na Fig. 4.

Evolução dos microsatélites

Além de variarem no tamanho, ou seja, no número de repetições do dímero GA, três estruturas básicas de microsatélites foram observadas nas amostras (Fig. 3 e 4). A primeira sendo uma repetição simples de GA_n , além de duas estruturas complexas, GA_nTA e $GA_1AA_1GA_n$. As estruturas complexas do microsatélite parecem ter evoluído independentemente a partir do repeat GA_n . Uma quarta estrutura, $GA_nAA_1CA_1$, ainda foi observado em linhagens externas ao grupo, como em *Tripsacum pilosum*, novamente representando uma evolução independente a partir da estrutura básica GA_n .

As seqüências dos teosintes são quase todas do tipo GA_n , com o tipo GA_nTA sendo representado em um acesso de *Zea mays mexicana* e também uma vez em *Zea mays parviglumis*, sugerindo que o tipo GA_n é o tipo pleisomorfo, como seria de se esperar em uma evolução de microsatélites.

Todas as três estruturas de microsatélites estão representadas nas amostras de milho da América Central, mas distintos padrões biogeográficos ocorrem na América do Sul (Fig. 4). A estrutura primitiva GA_n esta presente ao longo da parte oeste da Cordilheira dos Andes, em locais como Peru e Chile. As estruturas complexas, por outro lado, estão presentes na parte leste do continente, no Brasil e Paraguai, com o tipo $GA_1AA_1GA_n$ parecendo restrito às bacias dos rios São Francisco e Paraná.

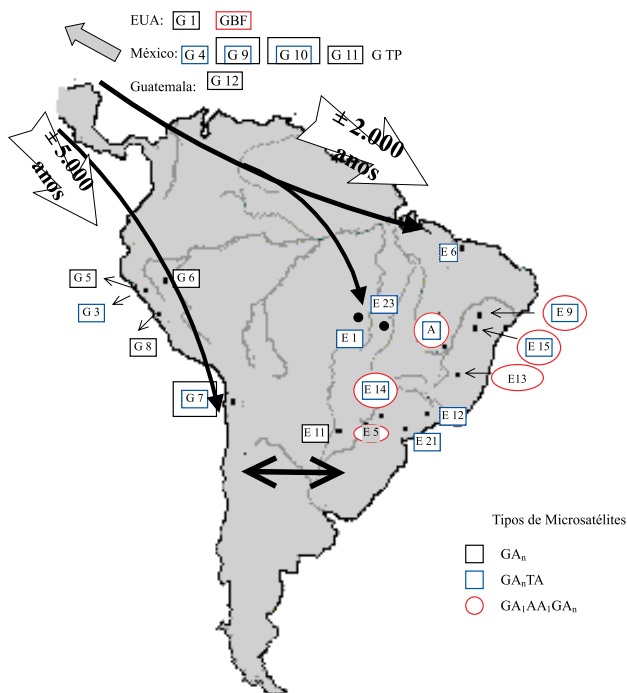


Fig. 4. Mapa com a localização da origem das amostras utilizadas neste estudo e o tipo de microsatélites encontrado no gene *Adh2*, de cada uma delas. Note que o tipo simples GA_n aparece mais restrito a região Andina, enquanto os dois complexos, $GAnTA$ e $GAAAGAn$ aparecem na região das terras baixas da América do Sul, sugerindo duas levas introdutórias de alelos distintas, a primeira tendo ocorrido por volta de 5.000 anos atrás, trazendo variedades com o tipo simples e, a segunda, trazendo os dois complexos, provavelmente ocorreu por volta de 2.000 anos atrás. Ainda, existe evidência de fluxo gênico entre alelos destas duas levas na região sul da América do Sul, indicada pela seta dupla.

Esta distinção biogeográfica entre o tipo de microsatélite simples e complexo também é observado entre as amostras arqueológicas, onde as amostras arqueológicas do Peru apresentam somente o padrão simples GA_n , enquanto as amostras do Vale do Peruaçu só apresentam os outros dois tipos complexos. Portanto, parece ser o caso de que a distribuição atual das estruturas de microsatélites na América do Sul se deve mais a um fenômeno antigo do que a um fenômeno moderno.

Existem ainda evidências de fluxo gênico na região sul da América do Sul, onde o complexo GA_nTA ocorre na amostra arqueológica de 1500 anos de Tenney, no norte do Chile (Goloubinoff et al, 1993), e o tipo simples GA_n ocorrendo na amostra moderna de milho indígena Guarani Moroti-Guapi, no Paraguai.

Expansão recente de populações de milho

A mais antiga amostra arqueológica da América do Sul é peruana e não contém complexos de microssatélites, sugerindo que os primeiros acessos de milho que entraram na América do Sul continham apenas o tipo simples GA_n . Similarmente, o conjunto gênico moderno desta região continua apresentando em sua maioria somente microssatélites do tipo simples, com raras exceções, sugerindo que o conjunto gênico da América Central somente continha o tipo simples GA_n quando a expansão do milho em direção a região oeste da América do Sul ocorreu.

A mais antiga evidência de milho com o complexo de microssatélite vêm da amostra de 1500 anos do Chile, na qual a estrutura GA_nTA ocorre. A taxa de mutação calculada para as amostras arqueológicas do grupo GA_nTA é de $1,30 \times 10^{-6}$ substituições/ site/ ano, o que é muito próximo do dado encontrado para as amostras modernas, de $1,03 \times 10^{-6}$ substituições/ site/ ano (Freitas, 2001; Freitas et al – em edição). Esta taxa de substituição de bases é mais ou menos 60 vezes maior do que o valor calculado de $1,6 \times 10^{-8}$ substituições/ site/ ano, para o gene *Adh1* (Gaut & Clegg, 1991). Esta taxa de evolução maior do milho pode ser suportada pelo fato de que as amostras arqueológicas mostram mais ou menos metade da diversidade encontrada nas amostras modernas, contrariando os achados de Goloubinoff et al (1993).

Discussão

Os dados deste estudo suportam a idéia da entrada do milho na América do Sul ter ocorrido por duas direções. A primeira é a partir da América Central, descendo pelo lado oeste dos Andes até o Peru e Chile, carregando o tipo simples de microssatélite GA_n . Aparentemente os tipos complexos de microssatélites ainda não estavam presentes no conjunto gênico do milho daquela época. O complexo GA_nTA ocorre atualmente em populações de *Zea mays mexicana* (Goloubinoff et al, 1993), o que sugere que este complexo pode ter evoluído dentro do conjunto gênico do teosinte ao invés do milho.

É possível que os complexos de microssatélites tenham entrado no conjunto gênico do milho através de introgressões secundárias, antes do milho ter sido envolvido em uma segunda expansão para a América do Sul, que ocorreu ao longo da costa leste, aparentemente através dos cursos principais de rios que deságuam no Oceano Atlântico.

A ausência do tipo simples GA_n na parte leste da América do Sul implica em uma fonte separada de milho da América Central, podendo inclusive ser o reflexo de um evento de domesticação separado, independente.

Piperno (1978), usando análises de fitólitos de milho, que são cristais minerais formados em tecido de plantas, encontrados em sítios arqueológicos do Panamá, sugere que o milho está presente no Panamá desde o período pré-cerâmico (5.000 – 2.800 AC), mas o interessante é que os fitólitos de milho desta época só aparecem nos sítios arqueológicos das regiões de altas altitudes. Nas regiões de baixas altitudes, ao longo dos rios, a presença do milho só começa a aparecer a partir do ano 1.000 AC.

A autora diz que em 1.000 AC houve uma grande mudança de orientação das características de assentamentos humanos e de agricultura de subsistência na região. Os focos de assentamento se tornaram as planícies inundáveis dos principais rios, inclusive com a introdução nestas regiões de novas plantas cultivadas, como o milho.

Como é reconhecido atualmente que o milho deve ter sido domesticado primeiramente nas regiões mais elevadas do México, é provável que as primeiras raças de milho que cruzaram o Panamá em direção à América do Sul fossem adaptadas às altas altitudes, trazidas por populações culturalmente também adaptadas a tais ambientes, chegando e difundindo esta planta na América do Sul em regiões afins às suas culturas, como os Andes. Somente depois que o milho foi melhorado e adaptado às regiões de baixas altitudes, é que ele pode ter passado a ser difundido por populações com culturas de terras baixas, chegando à América do Sul e, desta vez, sendo difundido pelas regiões das terras baixas e cursos de rios.

Acreditamos que na primeira leva, as raças somente traziam o tipo simples de microssatélite GA_n e, na segunda leva, trouxeram os dois complexos GA_nTA e $GA_1AA_1GA_n$. A idade de 1.000 anos AC para a passagem da segunda leva pelo

Panamá, inclusive, colabora com os dados levantados em nosso trabalho, relatados anteriormente.

McClintock et al (1981), estudando diferentes variedades tradicionais de milho de todas as três Américas, através de análises citológicas de Knobs cromossômicos visualizados em células de milho na fase de paquíteno, também sustentam a hipótese de duas levas separadas de chegada de milho na América do Sul, como forma de explicar as variações genéticas apresentadas pelas variedades tradicionais existentes. Os autores ainda comentam que algumas das variedades estudadas do Chile apresentaram uma correlação muito grande com variedades de milho do Brasil Central e Sul. Este dado é muito interessante, pois a única evidência de fluxo genético encontrado em nosso trabalho é entre a amostra arqueológica de 1.500 anos do Chile com a amostra E11 do Paraguai, demonstrando que as populações que habitavam a região sul do continente mantinham um certo grau de contato e troca de mercadorias, como evidenciam estes dados, além de outras evidências culturais e arqueológicas apresentadas pela literatura (Steward, 1963; Bueno. 1998).

Conclusão

A partir dos dados levantados e com os já existentes, pode-se relatar algumas conclusões.

A primeira delas, como descrito anteriormente é de que, historicamente, ocorreu mais de uma entrada de milho na América do Sul, de tipos diferentes, em épocas distintas e seguindo e colonizando áreas diferentes, como demonstram os dados genéticos.

As populações de milho que possuem os complexos de microssatélites parecem ser mais jovens e incluem a maioria das variedades tradicionais modernas e comerciais analisadas neste estudo. Os dados suportam a ocorrência de uma introgressão secundária ou um segundo evento de domesticação do milho, originando estes novos tipos, seguido de um aumento da taxa de evolução causado presumivelmente por seleção artificial. Estes achados são compatíveis com as observações feitas por Doebley et al(1986) em milho do tipo Northern Flint, os quais possuem uma história de aproximadamente 1.000 anos.

Ainda, este estudo demonstra que as populações indígenas pré-históricas, que habitavam a região do Vale do Paraíba – Brasil, no passado, tiveram uma influência cultural-alimentar muito grande da região da América Central e praticamente nenhuma da região dos Andes Centrais, como o Peru, fato este que ainda ocorre nos dias atuais nas amostras indígenas e tradicionais utilizadas no presente estudo, o que sugere a existência de um certo nível de isolamento cultural antigo entre as populações das terras altas com as das terras baixas da América do Sul, pelo menos em termos do milho. Este isolamento cultural do passado foi ainda mais reforçado quando nosso continente foi colonizado pelos Europeus, onde as terras baixas ficaram sob influência portuguesa e as terras altas com os espanhóis, mantendo qualquer isolamento cultural antes existente entre as duas áreas da América do Sul.

Outro fato que reforça esta ideia é em relação ao complexo microssatélite GA₁AA₁GA_n, cujo registro mais antigo de sua presença até o momento se dá em duas amostras arqueológicas de Januária –MG, ambas com idades de 570 ± 60 anos atrás. Ao olharmos a distribuição geográfica deste alelo, vemos que ele é ainda mais restrito do que o outro complexo GA_nTA, aparecendo apenas na parte leste do Brasil e em populações modernas do sul dos EUA.

O fato deste complexo aparecer até o momento somente há 570 anos atrás em Januária e especificamente em apenas um dos três sítios arqueológicos da área, enquanto o outro complexo aparece naquela região desde 1000 anos e nos três sítios arqueológicos estudados, sugere duas possibilidades: Uma que ele poderia ser um alelo mais raro e por isto sua detecção é mais difícil. Entretanto, como sua presença nas amostras modernas também se faz mais rara, ficando restrita a determinadas variedades (ver tabela), pode-se sugerir que este alelo seja mais novo e por isto sua distribuição geográfica é mais restrita.

É interessante notar que a época e a região abrangida por este complexo mais raro coincide com a provável expansão indígena Tupi, a qual acredita-se ter ocorrido a partir da região central do Brasil para o litoral atlântico, colonizando e dominando culturalmente toda a costa leste sul americana. Caso este alelo tenha surgido entre variedades de milho sob manejo daquelas culturas indígenas, isto pode explicar o porque deste alelo aparecer somente em registros mais recentes de Januária e estar geograficamente mais limitado.

Por último, este trabalho também mostra que fragmentos de DNA oriundos de amostras arqueológicas de plantas cultivadas encontradas em regiões tropicais podem ser preservados e utilizadas em estudos históricos e genéticos-evolutivos.

Considerações Finais

Os dados levantados a partir das amostras de milho nos fornecem grandes evidências sobre a história evolutiva e de difusão desta planta através das diversas regiões da América Central e do Sul, indicando os possíveis caminhos por onde e quando as diferentes variedades desta planta devem ter percorrido.

Como esta planta é altamente ligada ao homem, esta difusão se fez através das culturas humanas que a cultivavam, permitindo assim que, em paralelo, parte da história humana também possa ser melhor conhecida. Entretanto, ainda faltam muitos dados para ilustrar toda esta história, mas esperamos que este trabalho possa contribuir para que, junto com outros pesquisadores de áreas afins, usando materiais, técnicas e ferramentas complementares, possamos estar contribuindo para que esta história fique cada vez mais rica e precisa.

Agradecimentos

Agradeço a Robin Allaby e Terrence Brown por ter cedido seu conhecimento e laboratório para a realização da parte prática deste estudo. A UMIST-Manchester/ Inglaterra, pelo apoio a minha pesquisa; ao Departamento de Genética e ESALQ; ao Dr. Gehard Bandel pelo seu apoio ao meu trabalho; a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro; e ao Museu de Arqueologia de Belo Horizonte (MG) pelo empréstimo das amostras arqueológicas.

Gostaria ainda de dedicar este trabalho às aquelas populações indígenas do passado que aqui habitavam e que plantaram, colheram e guardaram, através do tempo e arte, os alimentos que hoje estudamos, muito obrigado.

Referências Bibliográficas

- ALLABY, R. G.; BROWN, T. A. Network analysis provides insights into the evolution of 5S rDNA arrays in *Triticum* and *Aegilops*. **Genetics**, v. 157, p. 1331-1336, 2001.
- ALLABY, R. G.; O'DONOGHUE, K.; SALLARES, R.; JONES, M. K.; BROWN, T. A. Evidence for the Survival of Ancient DNA in Charred Wheat Seeds from European Archaeological Sites. **Ancient Biomolecules**, v. 1, p. 119-129, 1997.
- BUENO, E. **Náufragos, traficantes e degradados**. Rio de Janeiro: Objetiva, 1998.
- DENNIS, E. S.; SACHS, M. M.; GERLACH, W. L.; FINNEGAN, E. J.; PEACOCK, W. J. Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase 2 (*Adh2*) gene of maize. **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, p. 727-743, 1985.
- DOEBLEY, J. Molecular evidence and the evolution of maize. **Economic Botany**, New York, v. 44, n. 3, p. 6-27, 1990. Suppl.
- DOEBLEY, J.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Exceptional genetic divergence of Northern Flint corn. **American Journal of Botany**, Bronx, NY v. 73, p. 64-69, 1986.
- DOEBLEY, J.; STEC, A.; HUBBARD, L. The evolution of apical dominance in maize. **Nature**, London, v. 386, p. 485-488, 1997.
- EYRE-WALKER, A.; GAUT, R. L.; HILTON, H.; FELDMAN, D. L.; GAUT, B. Investigating the bottleneck leading to the domestication of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 95, p. 4441-4446, 1998.
- FORSTER, P.; HARDING, R.; TORRONI, A.; BANDELT, H. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: A reappraisal. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 59, p. 935-94, 1996.
- FREITAS, F. O. **Estudo genético evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays mays*, L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**.

As Expansões do Milho – *ZEA MAYS MAYS*, L. - para a América do Sul, baseado no resgate e estudo de DNA antigo de amostras arqueológicas

Piracicaba. 2001. 125 f. Teses (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP, Piracicaba.

FREITAS, F. O.; MARTINS, P. S. Calcite crystals inside archaeological plant tissue. **Journal of Archaeological Science**, v. 27, p. 981-985, 2000.

FREITAS, F. O.; ALLABY, R. G.; BROWN, T. A.; BANDEL, G. Evidence for two expansions of maize (*Zea mays*) into South America based on genetic evidence from primitive landraces and ancient DNA. **Journal of Archaeological Science** (aceito – em edição)

GAUT, B. S.; CLEGG, M. T. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, DC, v. 88, p. 2060-2064, 1991.

GOLOUBINOFF, P.; PÄÄBO, S.; WILSON, A. C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. **Proceedings of the National Academy Sciences**, Washington, DC, v. 90, p. 1997-2001, 1993.

JUNQUEIRA, P. A.; MALTA, I. M. Horticultores e ceramistas pré-históricos do nordeste de Minas Gerais. **Arquivos do Museu de História Natural/ UFMG**, Belo Horizonte, v. 67, p. 275-289, 1981-82.

MCCLINTOCK, B.; KATO, T. A. Y.; BLUMENSCHNEIN, A. **Chromosome constitution of races of maize**. Chapingo, México: Colegio de postgraduados, 1981. p. 517.

PESSENDA, L. C. R.; CAMARGO, P. B. Radiação radiocarbônica de amostra de interesse arqueológico e geológico por espectrometria de cintilação líquida de baixo nível de radiação de fundo. **Química Nova**. v. 14, p. 98-103. 1991.

PIPERNO, D. R. **The application of phytolith analysis to the reconstruction of plant subsistence and environments in prehistoric Panama**. 1983. 459 f. Thesis (PhD) - Temple University.

SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, v. 129, p. 555-562, 1991.

As Expansões do Milho – *ZEA MAYS MAYS*, L. - para a América do Sul, baseado no resgate e estudo de DNA antigo de amostras arqueológicas

STEWART, J. H. South American cultures: an interpretation. In: HANDBOOK of South American Indians. New York: Cooper Square, 1963. v. 2. p. 916.

TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. **Science**, Washington, DC, v. 277, p. 1063-1066, 1997

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1993.

VELOSO, T. P. G.; RESENDE, E. M. T. P. Vestígios alimentares nos sítios arqueológicos sob abrigos de Minas Gerais. In: Congresso ABEGUA, 3., 1992, Belo Horizonte. **Anais**. [S. l. : s. n. 1992]. p. 389-414.