Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Padrões de dispersão e conservação da diversidade genética do milho (*Zea mays* ssp. *mays*) nas terras baixas da América do Sul

Flaviane Malaquias Costa

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2020

Flaviane Malaquias Costa
Engenheira Agrônoma

Padrões de dispersão e conservação da diversidade genética do milho (*Zea mays* ssp. *mays*) nas terras baixas da América do Sul

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Costa, Flaviane Malaquias

Padrões de dispersão e conservação da diversidade genética do milho (*Zea mays* ssp. *mays*) nas terras baixas da América do Sul / Flaviane Malaquias Costa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

126 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Migração 2. *Zea mays* ssp. *mays* 3. Centros de Diversificação 4. Indicadores de diversidade 5. Recursos genéticos 6. Hotspots de agrobiodiversidade 7. Variedades locais 8. Etnobotânica 9. Marcadores SNPs. I. Título

OFEREÇO,

Aos agricultores familiares do futuro,

que darão continuidade a evolução das espécies cultivadas.

DEDICO,

Aos agricultores familiares e indígenas

do passado e do presente.

À todas as pessoas que trabalham pela

construção de uma sociedade

mais justa e sustentável.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos últimos quatro anos, em busca de encontrar respostas para as nossas perguntas, nos dispersamos, assim como o milho, pelos campos e florestas deste continente. Conhecemos diferentes povos, desbravamos saberes e provamos peculiares sabores. Nos Pampas e na Mata Atlântica, vislumbramos a força dos guardiões da Agrobiodiversidade. No Cerrado, as sementes, com toda beleza, mostraram sua força e resistência. Na Amazônia, encontramos um milho raro e nos surpreendemos com a criatividade dos nativos para desfrutar os seus múltiplos usos. Na Caatinga, em busca de sementes de milho, descobrimos que também existem sementes humanas e vimos que é no Semiárido que a vida pulsa. Ao finalizarmos este trabalho, podemos dizer que as respostas que encontramos se multiplicaram em novas perguntas. E desta forma a Ciência caminha, trazendo luz ao desconhecido e inspirando novas questões. As perguntas sempre alimentaram a Ciência, assim como as sementes alimentaram a Humanidade. A realização desta pesquisa só foi possível devido a união de múltiplos esforços. Deste modo, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os envolvidos.

Manifesto o meu respeito e gratidão aos povos e agricultores ancestrais que no passado selecionaram, transformaram e domesticaram as plantas que hoje alimentam as sociedades humanas deste planeta, bem como agradeço aos agricultores familiares e indígenas do presente que seguem conservando e diversificando as plantas cultivadas.

À minha mãe Janete Malaquias Costa e ao meu pai Sebastião Costa, por me darem a vida e transmitirem algo dos seus genes. Por incentivarem os meus estudos e as minhas escolhas profissionais. Por serem suporte, amigos e parceiros em todos os momentos. Aos meus irmãos Fabrinni, Fabiola, Fernando e aos meus sobrinhos Luis Fernando e Pedro Fabrinni, pelo companheirismo e apoio em todas as horas.

Agradeço à minha orientadora Elizabeth Ann Veasey, pela orientação e pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação acadêmica. Expresso a minha admiração pela grande pesquisadora e profissional dedicada, que sempre se colocou à disposição para colaborar com a pesquisa e me orientar. Há pouco mais de quatro anos, o nosso colega Fábio de O. Freitas indicou o seu nome para ser a minha orientadora, hoje não tenho dúvidas que a indicação foi certeira. Além dos aprendizados acadêmicos, por meio da nossa convivência, estou certa que me tornei um ser humano melhor.

Agradeço aos meus grandes parceiros de trabalho e amigos, Natalia Almeida e Rafael Vidal, pela parceria de nove anos de estudo, trabalho e construção. A presença de vocês na minha trajetória acadêmica e pessoal foi muito enriquecedora. Me considero uma pessoa de sorte por fazer parte deste Trio Ternura e por todos os momentos que compartilhamos juntos.

Ao pesquisador Charles R. Clement, do Instituto de Pesquisa da Amazônia, pela colaboração na pesquisa desde a idealização do Projeto, antes de eu vir para Piracicaba, quando eu ainda estava amadurecendo o meu tema do Doutorado. Até o final, pelo apoio na revisão das análises, resultados e na discussão da pesquisa. Agradeço pelas suas exigências e provocações. Com você aprendi um pouco a "pensar".

Ao pesquisador Fábio de O. Freitas, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelas importantes contribuições para que essa pesquisa se concretizasse, desde a idealização da pesquisa até as discussões dos resultados finais.

Aos parceiros e à Rede de Pesquisa Colaborativa do Grupo Interdisciplinar de Estudos em Agrobiodiversidade (InterABio), pelo importante trabalho realizado em favor da conservação da agrobiodiversidade, pela mobilização dos agricultores e por todo auxílio para que a pesquisa fosse realizada nas distintas regiões envolvidas no projeto.

À Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), Associação dos Guardiões das Sementes Crioulas de Ibarama-RS, Guardiões Mirins, Prefeitura Municipal de Ibarama/RS e Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo apoio à pesquisa no estado do Rio Grande do Sul. À guardiã da agrobiodiversidade Eda Kluge e ao guardião Leonel Kluge, por todo o apoio à pesquisa e pela grande hospitalidade ao nos receber para realizar o trabalho em Ibarama. Jamais esqueceremos a nossa amizade e os dias que passamos juntos.

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Universidade Estadual de Maringá (UEM) e Banco Comunitário Lucinda Moreti, pelo apoio à pesquisa no Mato Grosso do Sul.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), Paróquia de Divino, Centro de Tecnologias Alternativas (CTA) e Sindicato dos Trabalhadores e Trabalhadoras Rurais na Agricultura Familiar, pelo apoio à pesquisa em Minas Gerais.

À Rede de Intercâmbios de Tecnologias Alternativas, ASPTA – Agricultura Familiar e Agroecologia, Rede Sementes da Paixão, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Semi-Árido, pelo apoio à pesquisa na Paraiba.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) e Reserva Agroextrativista Rio Ouro Preto (RESEX), pelo apoio à pesquisa em Rondônia.

À Comissão Pró-Índio (CPI-Acre), Associação do Movimento dos Agente Agroflorestais Indégenas do Acre (AMAAIAC) e EMBRAPA Acre, pelo apoio à pesquisa no Acre.

À Universidad de la Republica do Uruguai (UdelaR), campus Centro Regional del Este (CURE) e Red de Semillas Nativas y Criollas, pelo apoio à pesquisa no departamento de Rocha e Treinta y Tres.

Ao Centro Universitário de Tacuarembó (UdelaR/CUT), Centro Universitário de Rivera (UdelaR/CUR) e Bio-Uruguay, pelo apoio à pesquisa em Tacuarembó e Rivera.

À Sociedad de Fomento de Tala (SFT Tala), pelo apoio à pesquisa em Tala.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, por terem cedido o material do banco de germoplasma de milho para os nossos estudos.

Ao Marcos Cella, por todo o apoio técnico no campo, na casa de vegetação e no laboratório, e pela parceria e amizade que deixaram os dias de trabalho mais descontraídos e agradáveis.

Aos parceiros de campo Gabriel B. Fernandes, Paola Bianchini, Yolanda, Simone, Ana Flávia e Rubana, pelos momentos de trocas de experiências e de amizade que vivenciamos durantes os trabalhos de campo.

À professora Maria Imaculada Zucchi, pela importante contribuição nas análises genômicas, por meio da organização dos cursos de análise de dados realizados no Departamento de Genética, os quais me deram suporte para a realização das análises genômicas, pelas trocas de idéias e amizade. Você é uma inspiração enquanto pesquisadora e ser humano para muitas pessoas.

À pesquisadora Iris Satie Hayashi Shimano, do Laboratório de Genética Ecológica de Plantas da Esalq-USP, pela contribuição nas análises estatísticas realizadas para a classificação das raças de milho, e ao pesquisador Juan Burgueño, do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e trigo (CIMMYT), pela discussão sobre as análises estatísticas utilizadas.

Ao César Daniel Petroli e Juan Burgueño do CIMMYT, pelo processamento dos dados moleculares e apoio nas análises genômicas.

Ao João Paulo Viana, Humberto Fanelli e Diana Rozetto, pelo auxílio e discussão sobre as análises genômicas.

Ao Rafael Falcão, pela parceria e discussões sobre o trabalho de Redes e pela amizade.

Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelos ensinamentos nas disciplinas. Aos funcionários do Departamento, pelo apoio de sempre, em especial ao Fernandinho, Berdan e motorista Carlos. E ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade concedida.

Às professoras Taitiâny Karita Bonzanini, Maria Elisa Garavello e ao professor Paulo Moruzzi, do Departamento de Ciências Humanas, e à professora Elizabeth A. Veasey, por todos os aprendizados que me foram concedidos através do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE) e à professora Silvia Molina pelas oportunidade que me foram concedidas em sala de aula e por me inspirarem no exercício da docência.

À pesquisadora Flavia França Teixeira, por muito ter me incentivado a seguir na área dos Recursos Genéticos Vegetais, por sempre acompanhar a minha trajetória e torcer pela minha carreira.

Aos companheiros do grupo de estudos sobre as Relações Interpessoais no Ambiente Acadêmico e do projeto RECORE, pelas atividades que realizamos em conjunto e por trabalharmos para promover a qualidade de vida e saúde mental no ambiente acadêmico.

Às minhas companheiras e amigas de casa Renata, Sueme, Natalia, Marcela e ao nosso companheiro Humberto, por todos os momentos compartilhados, pelas trocas de experiências e aprendizados, por terem sido família e verdadeiro alento neste período.

Ao Luiz Gustavo, por ser um grande companheiro, pelo apoio e compreensão em todos os momentos. Pelo amor e por me fazer sentir uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus amigos Beto e Sandra, pelo companheirismo, amizade, passeios, trocas de experiências e por fazerem parte da minha família piracicabana.

Aos meus amigos Diego ‘Migo’, Albânia, Mari, Vanessa, Renata, Sueme, Luiz, Renan, Filipinho, Andreza, Rani, Nathalia, Marie, Danilo, Ithalo, Fernando, Jonathan, Igor, Diones, Camila, Cris Taniguti, Rui, Akiu e Gabriel Frasseto, pelos momentos de amizade, alegria e por terem deixado os meus dias melhores e mais leves.

Aos colegas do Laboratório de Genética Ecológica de Plantas, do Grupo de Pesquisa em Genética e Genômica da Conservação e da “Salinha”, em especial, à Taty, Gabriel, Ana Flávia, Íris, Igor, Carol Grando, Tiago Tristão, Wellington, Carol, Alisson, Thais, Santiago, Alessandro, Melina e Vanessa Rizi, pelas experiências e momentos de amizade compartilhados.

À Orquestra Educacional de Piracicaba e ao maestro Ivan Bueno, pelos aprendizados e oportunidade de participar de um trabalho coletivo tão nobre e vivenciar a música e a arte. Agradeço pelas

amizades, momentos de conforto e leveza que pude vivenciar junto ao grupo. A generosidade e as inspirações filosóficas do nosso maestro me tornaram um ser humano melhor.

Aos amigos da Casa Espírita Francisco de Assis, pela amizade, apoio e aprendizados vivenciados neste período.

À Silvana, Marcia Andrade, Salete, Regina e Graziela, pelo grande apoio, amizade e por me ajudarem a ser uma pessoa mais resiliente.

À FAPESP, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro à pesquisa e bolsa de estudos concedida.

À Deus pela vida e força que rege todas as coisas.

(...) viajo muito pela savana do meu país.
Nessas regiões encontro gente que não sabe ler livros.
Mas que sabe ler o seu mundo.
Nesse universo de outros saberes, sou eu o analfabeto.
Não sei ler sinais da terra, das árvores e dos bichos.
Não sei ler nuvens, nem o prenúncio das chuvas.
Não sei falar com os mortos,
perdi contato com os antepassados que nos concedem o sentido da eternidade.
Nessas visitas que faço à savana,
vou aprendendo sensibilidades que me ajudam a sair de mim
e a afastar-me das minhas certezas.
Nesse território, eu não tenho apenas sonhos.
Eu sou sonhável."
(Mia Couto)

SUMÁRIO

RESUMO....13
ABSTRACT....15
1. INTRODUÇÃO....17
1.1. OBJETIVOS....18
1.1.1. Objetivo Geral....18
1.1.2. Objetivos Específicos....18
REFERÊNCIAS....20
2. ORIGEM, DOMESTICAÇÃO E DISPERSÃO DO MILHO NAS AMÉRICAS....21
2.1. O SER HUMANO DOMESTICOU O MILHO OU O MILHO DOMESTICOU O SER HUMANO? O CEREAL DAS AMÉRICAS E SUA IMPORTÂNCIA PARA OS POVOS....21
2.2. ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DO MILHO NAS AMÉRICAS: QUANDO E ONDE?....23
2.3. GENÉTICA DA DOMESTICAÇÃO: COMO O MILHO FOI DOMESTICADO E QUAIS FORAM AS CONSEQUÊNCIAS?....26
2.4. POR QUE OS HUMANOS DOMESTICARAM O MILHO?....29
2.5. DISPERSÃO DO MILHO NAS AMÉRICAS: O EVENTO QUE AMPLIOU A DIVERSIDADE GENÉTICA....30
REFERÊNCIAS....34
3. PADRÕES DE DISPERSÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO MILHO NAS TERRAS BAIXAS DA AMÉRICA DO SUL....41
RESUMO....41
ABSTRACT....42
3.1. INTRODUÇÃO....43
3.2. MATERIAL E MÉTODOS....46
3.2.1. Abrangência geográfica e coleta de germoplasma....46
3.2.2. Caracterização fenotípica das variedades locais de milho....46
3.2.3. Caracterização molecular das variedades locais de milho....47
3.2.4. Extração de DNA do material vegetal....48
3.2.5. Marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) pela técnica DArtSeq....48
3.2.6. Análise estatística dos dados moleculares....49
3.2.7. Distribuição geográfica da diversidade genética para estudo da dispersão do milho....50
3.3. RESULTADOS....50
3.3.1. Estruturação e diversidade genética do milho nas terras baixas da América do Sul....50
3.3.2. Distribuição geográfica da diversidade genética do milho nas terras baixas da América do Sul....59
3.4. DISCUSSÃO....62
3.4.1. Dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul....62
3.4.2. Potenciais centros de diversificação do milho nas terras baixas da América do Sul....65
REFERÊNCIAS....69
4. MICRO-CENTROS DE DIVERSIDADE GENÉTICA DO MILHO NAS TERRAS BAIXAS DA AMÉRICA DO SUL....75
RESUMO....75
ABSTRACT....76
4.1. INTRODUÇÃO....77
4.2. MATERIAL E MÉTODOS....79
4.2.1. Caracterização etnobotânica....81
4.2.2. Diagnóstico das fortalezas, oportunidades, fragilidades e ameaças na conservação da agrobiodiversidade....82
4.2.3. Caracterização fenotípica....82
4.2.4. Caracterização molecular....83

4.2.5. Índices de diversidade genética como ferramenta metodológica para identificação de microcentros de diversidade do milho *84*
4.3. RESULTADOS 85
4.3.1. Indicadores etnobotânicos do milho em regiões das terras baixas da América do Sul *85*
4.3.2. Indicadores fenotípicos do milho em regiões das terras baixas da América do Sul *89*
4.3.3. Indicadores moleculares do milho em regiões das terras baixas da América do Sul *90*
4.3.4. Ferramenta metodológica para identificação dos microcentros de diversidade do milho *90*
4.3.5. Diagnóstico das fortalezas, oportunidades, fragilidades e ameaças para a conservação da agrobiodiversidade nas terras baixas da América do Sul *92*
4.4. DISCUSSÃO 93
4.4.1. Indicadores que moldam a diversidade genética de variedades locais de milho em distintas regiões das terras baixas da América do Sul *93*
4.4.2. Micro-centros de diversidade genética do milho nas terras baixas da América do Sul *95*

REFERÊNCIAS 99

5. *ENTRELAÇADO*, UMA RAÇA DE MILHO RARA CONSERVADA NO SUDOESTE DA AMAZÔNIA 103

RESUMO 103

ABSTRACT 103

5.1. INTRODUÇÃO 104
5.2. MATERIAL E MÉTODOS 106
5.2.1. Caracterização etnobotânica *107*
5.2.2. Caracterização fenotípica das variedades locais de milho farináceo visando a identificação de raças *107*
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 108

REFERÊNCIAS 111

6. CONCLUSÕES 113

ANEXOS 115

RESUMO

Padrões de dispersão e conservação da diversidade genética do milho (*Zea mays* ssp. *mays*) nas terras baixas da América do Sul

O conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética de populações cultivadas é fundamental para entender a história evolutiva destas populações ao longo do processo de domesticação e dispersão. O milho (*Zea mays* ssp. *mays*) é uma espécie cultivada que apresenta grande variabilidade genética. A dispersão do milho para diferentes regiões permitiu o surgimento de centros de diversificação da espécie. A região das terras baixas da América do Sul é considerada centro secundário de diversidade do milho e evidências científicas sugerem que a espécie se dispersou do México e chegou nesta região em estado parcial de domesticação. O objetivo desta pesquisa foi estudar a diversidade genética e os padrões de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul, por meio de dados de genômica populacional, fenotípicos, etnobotânicos e registros históricos, os quais permitiram ampliar o conhecimento sobre a história do germoplasma da região. Estas informações poderão ser úteis para orientar futuras prospecções, esforços de conservação e valoração dos recursos genéticos do milho. Esta tese foi estruturada em diferentes capítulos. O primeiro estudo apresentou uma revisão bibliográfica sobre a origem, domesticação e dispersão do milho nas Américas. O segundo estudo discutiu as hipóteses de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul. Foram caracterizados 184 acessos de milho do Brasil e Uruguai por meio de 5.313 marcadores moleculares de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), obtidos pela técnica de *Diversity Arrays Technology* (DArTseq). Os acessos também foram caracterizados quanto ao tipo de endosperma e associados às famílias linguísticas indígenas relacionadas às respectivas regiões de origem. Os grupos obtidos pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) se estruturaram, principalmente, pela predominância de tipos de endosperma específicos. A análise de agrupamento pelo método de *Neighbor-Joining* e distância genética de Nei identificou padrões de conexão inter-regional, os quais sugeriram movimentos de dispersão. Os padrões genéticos regionais foram associados aos registros arqueológicos da espécie e às migrações humanas Arawak e Tupi, o que permitiu sugerir as hipóteses de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul. A pesquisa ainda sugeriu a hipótese de dois potenciais centros de diversificação do milho nas terras baixas da América do Sul, que envolvem o Sudoeste da Amazônia e as região do Pampa do Brasil e Uruguai. O terceiro estudo teve como objetivo identificar micro-centros de diversidade do milho nas terras baixas da América do Sul. Foram realizadas coletas de variedades locais e entrevistas com agricultores em cinco estados do Brasil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Rio Grande do Sul e Rondônia) e cinco departamentos do Uruguai (Canelones, Rocha, Treinta y Tres, Tacuarembó e Rivera), contemplando cinco biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa). Foram obtidos indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares os quais permitiram estimar índices de diversidade genética, como ferramenta metodológica para identificação e caracterização dos micro-centros de diversidade do milho. Os micro-centros de diversidade foram identificados considerando os seguintes critérios diagnosticados em cada região: i) riqueza e diversidade genética de variedades locais (a maior parte exclusiva) e raças de milho; ii) presença de variedades locais sob diversificação devido a ação humana corrente diagnosticada pelos aspectos socioculturais; e iii) diversidade genética diagnosticada por meio de índices etnobotânicos, fenotípicos e moleculares, os quais indicaram áreas de conservação e acumulação de germoplasma de milho, em escala geográfica microrregional. Estas regiões também são sugeridas como *hotspots* de agrobiodiversidade, por encontrarem-se em zonas vulneráveis à erosão genética. O quarto estudo prospectou o milho do Sudoeste da Amazônia, região indicada como centro de diversificação do milho, dentro da qual foi considerada a hipótese de que as raças localmente desenvolvidas foram extintas durante a colonização européia. Foram conduzidos estudos etnobotânicos *in loco* e caracterização fenotípica das variedades locais de milho farináceo cultivadas por agricultores locais e indígenas, nos estados de Rondônia e Acre. Foram identificados nomes indígenas e locais, usos gerais e específicos para a raça de milho amazônica *Entrelaçado*. As variedades locais coletadas na região foram caracterizadas e classificadas como *Entrelaçado*, confirmando a sua

identificação e demonstrando que esta raça está conservada no Sudoeste da Amazônia. Esta pesquisa ampliou o conhecimento sobre a história evolutiva e a diversidade genética do milho nas terras baixas da América do Sul, envolvendo uma amostragem mais ampla. As informações geradas pela pesquisa poderão subsidiar políticas públicas e programas de conservação dos recursos genéticos do milho nas terras baixas da América do Sul.

Palavras-chave: migração, *Zea mays* ssp. *mays*, centros de diversificação, indicadores de diversidade, recursos genéticos, hotspots de agrobiodiversidade, variedades locais, etnobotânica, marcadores SNPs.

ABSTRACT

Dispersion patterns and conservation of maize (*Zea mays* spp. *mays*) genetic diversity in the lowlands of South America

Knowledge about the diversity and genetic structure of cultivated populations is essential to understand the evolutionary history of these populations throughout the process of domestication and dispersal. Maize (*Zea mays* ssp. *mays*) is a cultivated species that presents high genetic variability. The dispersion of maize to different regions allowed the emergence of centers of diversification of the species. The lowlands of South America region is considered a secondary center of maize diversity and scientific evidence suggests that the species dispersed from Mexico and arrived in this region in a partial state of domestication. The objective of this research was to study the genetic diversity and dispersal patterns of maize in the lowlands of South America, using population genomics, phenotypic and ethnobotanical data, and historical records, allowing the expanding of knowledge about the history of this germplasm in the region. This information may be useful to guide future prospects, conservation efforts and the valorization of the genetic resources of maize. This thesis was structured in different chapters. The first study presented a literature review on the origin, domestication and dispersion of maize in the Americas. The second study discussed the hypotheses of maize dispersion in the lowlands of South America. A total of 184 maize accessions from Brazil and Uruguay were characterized using 5,313 single nucleotide polymorphisms (SNPs), obtained by the Diversity Arrays Technology technique (DArTseq). The accessions were also characterized as to the type of endosperm and association with indigenous language families related to the respective regions of origin. The groups obtained through the Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) were structured mainly according to the predominance of specific types of endosperm. The cluster analysis using Nei´s genetic distance and *Neighbor-Joining* method identified interregional connection patterns, which suggested dispersion movements. The regional genetic patterns were associated with the archaeological records of the species and with the Arawak and Tupi human migrations, suggesting the hypothesis of maize dispersion in the lowlands of South America. The research also suggested the hypothesis of two potential centers of diversification of the maize in the lowlands of South America, which involve the Southwest of the Amazon and the Pampa regions of Brazil and Uruguay. The third study aimed to identify microcenters of maize diversity in the lowlands of South America. Landraces were collected and interviews were conducted with farmers in five states in Brazil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Rio Grande do Sul and Rondônia) and five departments of Uruguay (Canelones, Rocha, Treinta y Tres, Tacuarembó and Rivera), covering five biomes (Amazon, Cerrado, Caatinga, Atlantic Forest and Pampa). Ethnobotanical, phenotypic and molecular indicators were obtained allowing the estimation of genetic diversity indices, as a methodological tool for the identification and characterization of the microcenters of maize diversity. The microcenters of diversity were identified considering the following criteria diagnosed in each region: i) richness and genetic diversity of maize landraces (mostly exclusive) and races; ii) presence of landraces under diversification due to current human action diagnosed by socio-cultural aspects; and iii) genetic diversity diagnosed by ethnobotanical, phenotypic and molecular indices, which indicated conservation areas and accumulation of maize germplasm, on a microregional geographic scale. These regions are also suggested as agrobiodiversity hotspots, as they are in areas vulnerable to genetic erosion. The fourth study prospected maize from the Southwest of the Amazon, a region indicated as a center of maize diversification, within which the hypothesis that locally developed races were extinct during European colonization was considered. On-site ethnobotanical studies and phenotypic characterization of floury maize landraces cultivated by local and indigenous farmers in the states of Rondônia and Acre were conducted. Indigenous and local names, general and specific uses for the *Entrelaçado* Amazonian maize race were identified. The local varieties collected in the region were characterized and classified as *Entrelaçado*, confirming its identification and demonstrating that this race is conserved in the Southwest of the Amazon. This research expanded knowledge about the evolutionary history and genetic diversity of maize in the lowlands of South America, involving a broader sampling.

The information generated by this research may subsidize public policies and programs for the conservation of the genetic resources of maize in the lowlands of South America.

Keywords: migration, *Zea mays* ssp. *mays*, centers of diversification, ethnobotany, genetic variability, microcenters, genetic resources, landraces, SNPs markers.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho assume papel essencial na constituição da base alimentar em diversos países (Kato et al., 2009). A dispersão da espécie para diferentes regiões permitiu o surgimento de centros de diversificação do milho distribuídos em distintos ambientes ao longo do continente americano (Brieger et al., 1958; Vigouroux et al., 2008; Kato et al., 2009; van Heerwaarden et al., 2011). A domesticação do milho teve início há ~9.000 anos antes do presente (AP), no México (Piperno et al., 2009; Kistler et al., 2018), e muito cedo a espécie se dispersou, alcançando as terras baixas da América do Sul, há pelo menos ~6.500 anos AP (Brugger et al., 2016). Esta região é considerada centro secundário de diversidade do milho (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977) e evidências científicas sugerem que a espécie chegou nesta zona em estado parcial de domesticação (Kistler et al., 2018). As terras baixas da América do Sul abarcam regiões com altitudes inferiores a 1.500 m, as quais correspondem a 72% do continente sul americano (Paterniani e Goodman, 1977). Os estudos de diversidade genética do milho no continente americano realizados até o momento envolveram uma amostragem reduzida de acessos de milho representante desta região (Matsuoka et al., 2002; Freitas et al., 2003; Vigouroux et al., 2008; van Heerwaarden et al., 2011; Freitas e Bustamante, 2013; Bustamante et al., 2014; Bedoya et al., 2017; Kistler et al., 2018), o que sugere a necessidade da ampliação dos estudos da diversidade genética do milho desta zona.

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a diversidade genética e os padrões de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul, esta pesquisa foi realizada por meio de uma colaboração binacional, a qual envolveu instituições do Brasil e do Uruguai. No Brasil, a pesquisa foi coordenada pelo Laboratório de Genética Ecológica de Plantas da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo – ESALQ/USP e, no Uruguai, pelo Laboratório de Fitotecnia y Recursos Fitogenéticos da Universidad de la Republica. A realização deste trabalho só foi possível devido à colaboração de uma ampla rede de colaboradores a qual envolveu pesquisadores, professores, técnicos e estudantes, bem como a participação de agricultores familiares, assentados de reforma agrária, ribeirinhos e indígenas de diferentes regiões de ambos países. Em 2016, com o objetivo de desenvolver os projetos, foi criado o Grupo Interdisciplinar de Estudos em Agrobiodiversidade (InterABio) e à medida que os projetos avançaram foi constituída a Rede de Pesquisa Colaborativa do InterABio, a qual contou com a participação de instituições e organizações localizadas nas regiões contempladas pela pesquisa.

A pesquisa fez parte do (i) projeto de Auxílio à Pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), intitulado "Genômica populacional e caracterização fenotípica para elucidar aspectos da origem, domesticação e dispersão do urucum (*Bixa orellana*) e milho (*Zea mays*) nas terras baixas da América do Sul" (processo no. 2015/26837-0); (ii) projeto do edital Universal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), intitulado "Genômica populacional e classificação de raças para elucidar aspectos da dispersão do milho (*Zea mays* L.) nas terras baixas da América do Sul" (processo no. 421045/2016-7); e (iii) projeto da *Comisión Sectorial de Investigación Científica* (CSIC), intitulado "*Diversidad y distribución de razas de maíz de Uruguay: identificación de genes interés y micro centros de diversidad*".

A tese está estruturada em quatro estudos, apresentados em diferentes capítulos. O primeiro estudo foi apresentado em formato de capítulo de livro; o segundo e o terceiro, em formato de artigo científico; e o quarto, em formato de nota científica. O primeiro estudo consiste em uma revisão bibliográfica sobre os aspectos relacionados à origem, domesticação e dispersão do milho nas Américas. O segundo, ampliou o conhecimento sobre o histórico evolutivo do milho nas terras baixas da América do Sul, por meio do estudo dos padrões de dispersão da diversidade genética do milho nesta parte do continente. Resgatou-se a história do milho, por meio de uma viagem no tempo e no espaço, associada às migrações dos povos indígenas ancestrais que habitaram esta região no passado. O terceiro, identificou micro-centros de diversidade do milho e indicou zonas prioritárias de conservação por meio da indicação destas regiões como *hotspots* de agrobiodiversidade. Por meio da conservação *in situ-on farm* realizada por agricultores familiares, ribeirinhos e indígenas, a espécie ainda encontra-se sob diversificação nestas regiões no presente. O quarto estudo teve como objetivo prospectar o milho do Sudoeste da Amazônia, região indicada como centro de diversificação do milho, dentro da qual foi considerada a hipótese de que as raças localmente desenvolvidas foram extintas durante a colonização européia. No entanto, a presente pesquisa demonstrou a existência da raça amazônica *Entrelaçado* desde a época pré-conquista até os dias atuais e aponta que a raça não foi extinta e continua sendo conservada por agricultores tradicionais e povos indígenas que habitam a região, que atribuem nomes locais e indígenas à esta raça, e possuem usos culinários típicos.

A pesquisa ampliou o conhecimento sobre a história evolutiva do milho nas terras baixas da América do Sul. O entendimento da história de dispersão do milho é relevante uma vez que pode permitir a identificação de áreas com concentração de variabilidade genética que poderão orientar futuras prospecções e esforços de conservação dos recursos genéticos do milho, tanto *in situ-on farm* como *ex situ*, e que também poderão ser utilizados para o melhoramento genético da espécie.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

- Estudar a diversidade genética e os padrões de dispersão do milho (*Zea mays* L. ssp. *mays*) nas terras baixas da América do Sul, por meio de dados de genômica populacional, fenotípicos, etnobotânicos e registros históricos, com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a história do germoplasma da região, orientar futuras prospecções, esforços de conservação e valoração dos recursos genéticos do milho, o que poderá ser de utilidade para programas de melhoramento genético da espécie.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a diversidade genética do milho nas terras baixas da América do Sul, com o intuito de identificar pools gênicos distintos, caracterizar a distribuição geográfica da variação genética, por meio de marcadores moleculares *single nucleotide polymorphisms*

(SNPs), e com base nos registros históricos regionais discutir hipóteses de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul.

- Identificar micro-centros de diversidade do milho nas terras baixas da América do Sul, por meio de indicadores e índices etnobotânicos, morfológicos e moleculares de diversidade genética, em diferentes regiões e biomas do Brasil e do Uruguai.
- Prospectar o milho do Sudoeste da Amazônia, por meio da caracterização etnobotânica e fenotípica das variedades locais de milho farináceo, com o objetivo de identificar as raças de milho atualmente conservadas *in situ-on farm* na região.

REFERÊNCIAS

Brieger, F.G.; Gurgel, J.T.A.; Paterniani, E.; Blumenchein, A.; Alleoni, M.R. (1958) Races of maize in Brazil and other eastern South American Countries. National Academic of Sciences, Washington DC.

Brugger, S.O.; Gobet, E.; van Leeuwen, J.F.N.; Ledru, M.P.; Colombaroli, D.; van der Knaap, W.O.; et al. (2016) Longterm man-environment interactions in the Bolivian Amazon: 8000 years of vegetation dynamics. *Quaternary Science Reviews* 132:114-128.

Bedoya, C.A.; Dreisigacker, S.; Hearne, S.; Franco, J.; Mir, C.; Prasanna, B. M; Taba, S., Charcosset, A.; Warburton, M. L. (2017) Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PLoS One* 12(4), e0173488.

Bustamante, P. G.; Pádua, V. L. M.; Maia, V. H.; Ferreira, P. C. G. (2014) Evidence of maize (*Zea mays* L.) exploitation around an ancient crossroad linking different aboriginal American civilizations. *Acta Scientiae et Technicae* 29(1), 2317-8957.

Freitas, F.O.; Bandel, G.; Allaby, R.G.; Brown, T.A. (2003) DNA from primitive maize landraces and archaeological remains: implications for the domestication of maize and its expansion into South America. *Journal of Archaeological Science* 30:901-908.

Freitas, F.O.; Bustamante, P.G. (2013) Amazonian maize: diversity, spatial distribution and historical-cultural diffusion. *Tipití: Journal of the Society for the Anthropology of Lowland South America* 11(2):60-65.

Kato, T.A.; Mapes, C.; Mera, L.M.; Serratos, J.A.; Bye, R.A. (2009) Origen y diversificacion del maiz: una revision analítica. (1st ed.). Universidad Autónoma de México, Ciudad de México.

Kistler, L.M.; Maezumi, S.Y.; de Souza, J.G.; Przelomska, N.A.S.; Costa, F.M.; Smith, O.; Loiselle, H.; Ramos-Madrigal, J.; Wales, N.; Ribeiro, E.; Grimaldo, C.; Prous, A.P.; Gilbert, M.; Thomas P.; de Oliveira, F.F.; Allaby, R.G. (2018) Multi-proxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. *Science* 362:1309-1313.

Matsuoka, Y.; Vigouroux, Y.; Goodman, M. M.; Sánchez, J. J.; Buckler, E.; Doebley, J. F. (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:6080-6084.

Paterniani, E.; Goodman, M.M. (1977) Races of maize in Brazil and adjacent areas. CIMMYT, Mexico City.

Piperno, D.R.; Ranere, A.J.; Holst, I.; Iriarte, J.; Dickau, R. (2009) Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5019-5024.

van Heerwaarden, J.; Doebley, J.; Briggs, W.H.; Glaubitz, J.C.; Goodman, M.M. (2011) Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(3):1088-1092.

Vigouroux, Y.; Glaubitz, J.; Matsuoka, Y.; Goodman, M.M.; Sánchez, G.J.; Doebley, J.F. (2008) Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microstellites. *American Jornal of Botany* 95:1240-1253.

2. ORIGEM, DOMESTICAÇÃO E DISPERSÃO DO MILHO NAS AMÉRICAS

2.1. O ser humano domesticou o milho ou o milho domesticou o ser humano? O cereal das Américas e sua importância para os povos

Os cultivos das plantas são artefatos feitos e moldados pelos humanos, como uma panela de barro ou uma ponta de flecha. No entanto, o ser humano tornou-se tão dependente das plantas que cultiva que as plantas domesticaram a ele mesmo (Harlan, 1992; Diamond, 1997; Harari, 2014). Esta reflexão nos faz colocar a seguinte pergunta "*O ser humano domesticou as plantas ou as plantas domesticaram o ser humano?"*

A espécie humana considera-se dominante no planeta pelo fato de ter aprendido a domesticar o fogo, as paisagens, as plantas, os animais e os microrganismos. O surgimento das diferentes agriculturas como parte da evolução humana é resultado dos processos associados à domesticação da paisagem e das plantas. A domesticação permitiu ao ser humano a possibilidade de selecionar as plantas e cultivá-las para seu próprio consumo e benefício. Este processo foi decisivo na mudança do comportamento humano, permitiu o surgimento das civilizações, o crescimento populacional e a divisão de tarefas características de sociedades complexas (Clement et al., 2007).

A domesticação e a origem das agriculturas são consideradas processos coevolutivos dentro dos quais as espécies tornaram-se dependentes do manejo humano e, por outro lado, o desenvolvimento das sociedades humanas tornou-se dependente das espécies domesticadas e da agricultura. As populações de plantas cresceram em número e, consequentemente proporcionou o crescimento das populações humanas. As sociedades humanas são tão dependentes das espécies vegetais cultivadas e animais domesticados que a eliminação destas espécies causaria a morte da maioria da população humana atual, restando apenas aqueles grupos étnicos que não tenham desenvolvido essa dependência na produção de alimentos (Clement et al., 2009).

O caso da domesticação do milho retrata um evento dentro do qual distintas civilizações e povos americanos, tais como os Maias, Astecas, Incas, Arawak, Tupi e Guarani, tornaram-se suficientemente dependentes da cultura para se desenvolver, assim como o milho se tornou totalmente dependente dos seres humanos para sobreviver (Kato et al., 2009), sendo uma das espécies cultivadas com maior grau de domesticação. Obviamente, esta condição não é estrita ao milho. A relação do milho com as sociedades humanas apresenta um exemplo clássico do sucesso de um relacionamento coevolutivo e de codependência entre humanos e plantas domesticadas.

Podemos afirmar que o milho é a espécie emblemática do continente Americano, a qual possibilitou a conexão entre diferentes povos e promoveu o desenvolvimento e a sustentação destas civilizações ao longo do tempo. A cultura do milho constitui a base alimentar em diversos países desenvolvidos e em desenvolvimento. A espécie possui grande importância econômica e sociocultural, sendo um dos cereais mais produzidos mundialmente. As áreas de cultivo encontram-se entre as maiores e

estão distribuídas em distintas regiões da América e dos outros continentes (USDA, 2018), o que é passível de dizer que existem mais indivíduos que a própria espécie humana.

A versatilidade de usos permite que a espécie atenda desde as necessidades básicas na alimentação, sendo considerado um dos alimentos de base para a segurança alimentar de muitos países, até a produção de produtos processados em âmbito comercial e industrial. As diversas formas de uso do milho envolvem a produção de farinha, flocos de milho, amido de milho, xarope, etanol, óleo vegetal, plástico, tecido e cervejas. O milho constitui um ingrediente importante da gastronomia do Brasil e do Uruguai por marcar presença no cotidiano da população devido ao preparo e consumo de bolos, broa, pães, tortas, canjicas, cremes, pipocas, milho-verde, polentas, mingais, angú, munguzá, cuscuz e sopas.

O cereal se expressa como um elemento cultural, em diferentes contextos alimentares, dentro dos quais existem formas distintas e peculiares para o seu preparado como comida, conforme a região. No âmbito da antropologia da alimentação, a comida é uma expressão cultural quando é *produzida*, porque o ser humano não utiliza apenas o que encontra na natureza, mas por ser capaz de criar a própria comida. A comida é cultura quando é *preparada*, porque, uma vez adquiridos os produtos-base da sua alimentação, o ser humano *transforma* mediante o uso do fogo e de uma elaborada tecnologia que se exprime nas práticas e costumes da cozinha. A comida é cultura quando é *consumida*, porque as populações humanas *escolhem* a própria comida com critérios ligados tanto às dimensões econômicas, culturais e nutricionais, bem como pelas suas preferências individuais e coletivas e pelos seus gostos diversificados. (Montanari, 2008). Por meio de tais percursos, o milho se apresenta como elemento da identidade humana associado a diferentes contextos regionais, históricos e culturais.

A espécie também apresenta potencial para uso medicinal devido à presença de carotenoides denominados Luteína e Zeaxantina, os quais são benéficos à saúde humana e atuam na prevenção de doenças. Pesquisas científicas identificaram elevado teor destes carotenoides e antocianinas em farinhas, grãos e estigmas (cabelo do milho) em variedades locais de milho, em Santa Catarina, no Sul do Brasil (Kuhnen et al., 2009, 2010a,b, 2011, 2012). Estudos científicos como estes agregam valor às variedades locais de milho, que desta forma são indicadas para consumo de alimento funcional.

Uma variedade local corresponde a uma população dinâmica de uma espécie cultivada a qual possui origem histórica, identidade distinta e não passou pelo processo de melhoramento genético formal, sendo muitas vezes geneticamente diversificada, localmente adaptada e associada a um agroecossistema familiar (Zeven, 1998; Camacho Villa et al., 2006). As variedades locais constituem elementos fundamentais no desenvolvimento sustentável dos sistemas de cultivo e muitos termos são utilizados para mencioná-las. Os termos mais utilizados são variedades locais, variedades tradicionais, variedades crioulas, etnovariedades ou *landraces*, no inglês. Para referência neste trabalho, o termo variedade local será utilizado indistintamente em relação aos outros termos, referindo-se às variedades manejadas e reproduzidas por agricultores familiares (Costa et al., 2017), os quais envolvem comunidades tradicionais, indígenas, quilombolas e ribeirinhas, bem como agricultores de distintos perfis que praticam a agricultura familiar.

A cultura do milho atribui valores sociais e culturais para a agricultura familiar. Em nível social, um elevado número de agricultores depende do milho para garantir o sustento da família e a produção é destinada, sobretudo, para o auto-consumo da propriedade familiar, tanto para a alimentação humana em

um primeiro nível, quanto para a alimentação animal, como foi diagnosticado em uma pesquisa realizada em Santa Catarina, Brasil (Silva, 2015; Costa et al., 2017).

A produção de milho promove a realização de reuniões entre agricultores e atividades socioculturais coletivas, tais como: i) articulação e colaboração comunitária entre agricultores para a produção, manejo, colheita e conservação do milho; ii) mobilização de pessoas, histórias e processos de resgate, uso e conservação de variedades locais; iii) articulação de feiras de troca de sementes; iv) articulação entre artesãos e artesãs para a produção de artesanato feito com a palha do milho; v) festivais gastronômicos de pratos preparados com o milho; vi) festas juninas, sendo que no Brasil o milho se faz presente na preparação de distintos pratos; e vii) rituais e cerimônias religiosas, sobretudo, em comunidades indígenas.

A agricultura familiar pode ser fortalecida por meio de estratégias que agreguem valor à produção de variedades locais de milho, bem como pela identificação de novos nichos de mercados que incorpore estas variedades nos diferentes circuitos de comercialização. Estas medidas poderão promover a inclusão e a valorização dos agricultores familiares no mercado, além de promover a conservação da agrobiodiversidade. As variedades estão intimamente ligadas à agricultura familiar, fortalecem a autonomia do agricultor e contribuem para a construção de sistemas de produção de alimento mais sustentáveis. O milho, também consagrado como o "*Cereal das Américas"*, representa uma cultura milenar que ainda se estabelece como base da alimentação de muitos povos deste continente.

2.2. Origem e domesticação do milho nas Américas: quando e onde?

A domesticação de plantas se trata de um processo evolutivo, dentro do qual a seleção realizada por humanos em populações de plantas resulta em mudanças nas frequências alélicas das populações, tornando-as mais úteis ao ser humano e mais bem adaptadas às suas intervenções no ambiente (Clement, 1999). Uma das características mais observadas em plantas domesticadas é a grande variabilidade fenotípica. O milho é um exemplo clássico de uma espécie com muitas populações domesticadas.

O milho pertence à família *Poaceae.* O gênero *Zea* é composto por cinco espécies nativas do México e da América Central, as quais incluem o milho e seus parentes silvestres: *Z. mays, Z. diploperennis, Z. perennis, Z. luxurians* e *Z. nicaraguensis.* Os parentes silvestres do milho podem ser chamados de teosinto ou teosinte. A espécie *Z. mays* compreende quatro subespécies diplóides e anuais: *Zea mays* L. *ssp. mays* que corresponde ao milho propriamente dito; *Zea mays* L. *ssp. parviglumis* (daqui em diante *parviglumis*) e *Zea mays* L. *ssp. mexicana* (daqui em diante *mexicana*), ambos nativos do México; e *Zea mays* L. *ssp. huehuetenangensis*, teosinto endêmico da Guatemala (Doebley e Iltis, 1980; Doebley, 1990).

As subespécies *parviglumis* e *mexicana*, atualmente, ocupam nichos ecológicos distintos: *mexicana* é adaptada às regiões mais secas e frias do norte e centro do México (entre 1.700 e 2.600 metros), enquanto *parviglumis* é adaptada a regiões mais quentes do sudoeste do México (400 a 1.800 m de altitude) (Fukunaga et al., 2005). Estes teosintos são geograficamente distintos, exceto no leste do Rio das Balsas (Sudoeste do México) onde foram identificados indícios de fluxo gênico recorrente entre as duas subespécies. Esta região pode ser considerada uma zona de hibridação ou pode representar o conjunto de genes a partir do qual tanto *parviglumis* quanto a *mexicana* se diferenciaram (Fukunaga et al., 2005), com implicações diretas na origem e domesticação do milho.

As hipóteses sobre a origem e domesticação do milho são alvos de discussão desde o final do século XIX. Diferentes teorias propõem explicar como e quando ocorreu a domesticação da espécie. A teoria unicêntrica defende que o milho foi domesticado a partir de populações de *parviglumis* a partir de um único evento de domesticação, e que tal evento teria ocorrido na bacia do Rio Balsas, há aproximadamente 9.000 anos antes do presente (AP) (Matsuoka et al., 2002).

Por outro lado, em função da incrível diversidade presente no milho, a teoria multicêntrica levou à suposição de terem ocorrido múltiplos eventos de domesticação a partir de diferentes populações de teosinto, com a indicação de cinco centros de origem-domesticação e quatro centros primários de diversificação, todos localizados no México e na Guatemala (Kato et al., 2009). A teoria multicêntrica foi defendida devido à correlação particular entre os nós cromossômicos de populações de teosinto e de diferentes complexos raciais de milho e as regiões geográficas nas quais estão localizados (Kato, 2005). Diamond (1997) já havia considerado que múltiplos eventos de domesticação são comuns nas Américas, enquanto eventos únicos foram mais frequentes no Velho Mundo.

A teoria unicêntrica foi bastante concebida pela comunidade científica nos últimos anos devido às evidências genéticas (Matsuoka et al., 2002; Vigouroux et al., 2008; van Heerwaarden et al., 2011), arqueológicas (Piperno et al., 2009), e pelo fato da distribuição endêmica do progenitor *parviglumis* localizar-se na região do Rio Balsas (Fukunaga et al., 2005). No entanto, a discussão sobre a domesticação do milho vem sendo reascendida e discutida por novas evidências que revelam uma história complexa de domesticação da espécie. Kistler et al. (2018) sugerem que no Sudoeste da Amazônia o milho passou por um processo de domesticação parcial, uma vez que a espécie chegou nesta região semi-domesticado, desenvolvendo e fixando alelos neste local. A esta região foi atribuído o termo "centro secundário de melhoramento do milho" (Figura 1) (Kistler et al., 2018).

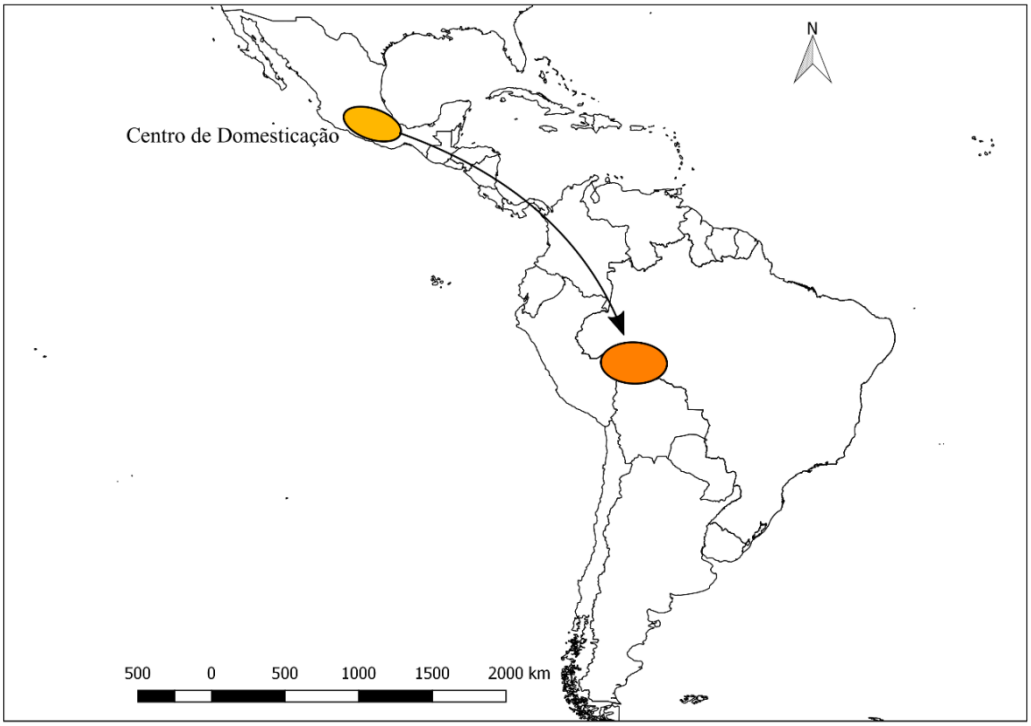

Figura 1. Centro de domesticação no México e centro secundário de melhoramento do milho na América do Sul, baseado no modelo de Kistler et al. (2018). Esta imagem foi elaborada por meio do *software* QGIS (http://qgisbrasil.org).

Segundo a teoria estratificada do milho (Kistler et al., 2018), a espécie evoluiu a partir das populações de *parviglumis*, no México, há ~9.000 anos AP, atravessou a América Central há 7.500 anos AP (Piperno et al., 1985) e se dispersou pelas terras baixas da América do Sul há ~6.500 anos AP (Bush, 1989; Brugger et al., 2016). As análises genômicas realizadas por Kistler et al. (2018) demonstraram que as populações de milho apresentaram assimetria na ancestralidade com *parviglumis*, o que reforça a teoria de que as populações ancestrais do milho sul americano se dispersaram do México em estado parcialmente domesticado, tornando-se isolado do pool gênico das populações silvestres do México, antes da fixação da síndrome de domesticação. Desta forma, populações estruturadas de milho com síndrome de domesticação estáveis evoluíram na América do Sul a partir de populações ancestrais parcialmente domesticadas advindas do México (Klister et al., 2018). A Figura 2 apresenta um esquema comparativo dos modelos de domesticação simples (i) e estratificada (ii) do milho proposto por Kistler et al. (2018).

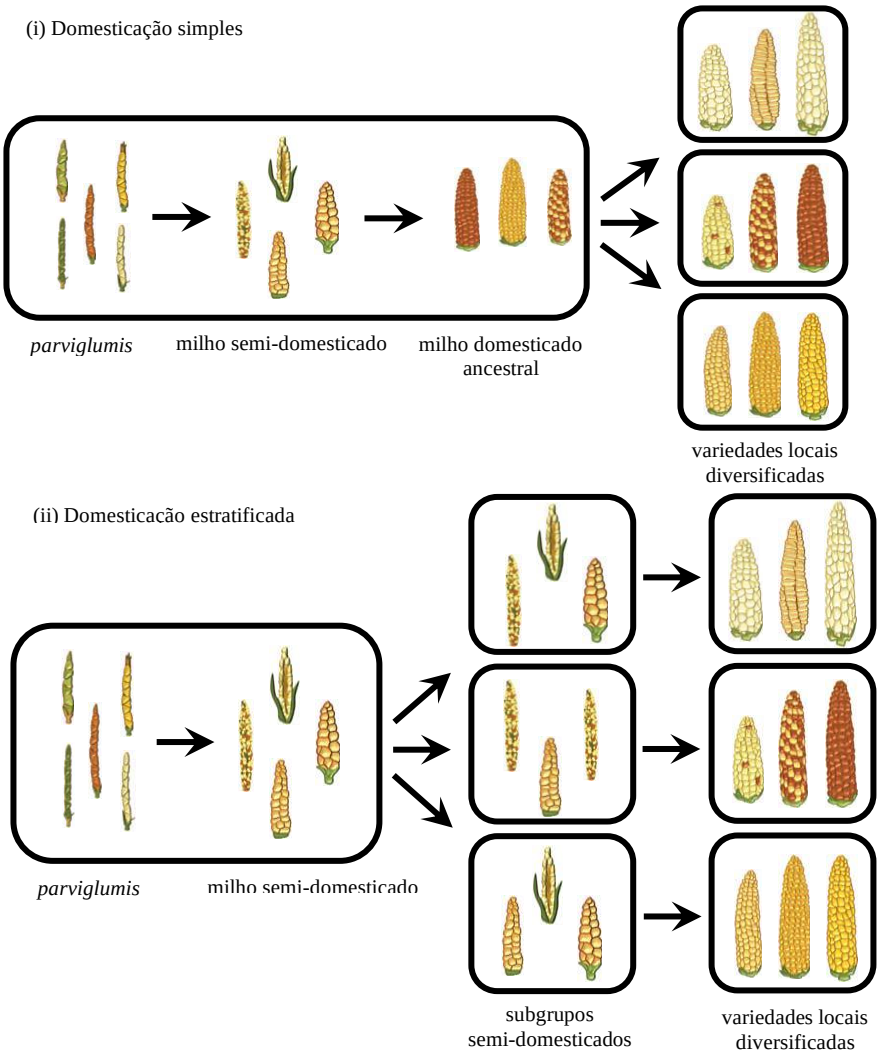

Figura 2. Esquema comparativo dos modelos de domesticação do milho. (i) Domesticação simples (teoria unicêntrica): o milho se tornou totalmente domesticado e depois se dispersou pelas Américas; (ii) Domesticação estratificada: subpopulações de milho parcialmente domesticadas se dispersaram e tornaram-se isoladas reprodutivamente antes da síndrome de domesticação. Fonte: adaptado de Kistler et al. (2018).

Análises genéticas em locos envolvidos na domesticação foram realizadas em dois genomas arqueológicos de milho da região do Vale de Tehuacan, no México. Os resultados demonstraram um estado

de domesticação parcial das amostras, as quais foram datadas de ~5300 anos AP (Ramos-Madrigal et al., 2016; Vallebueno-Estrada et al., 2016). Estas evidências corroboram com as hipóteses de Kistler et al. (2018), visto que registros arqueológicos comprovam que o milho já havia chegado na América do Sul há pelo menos ~7.150 anos AP no Equador (Stothert, 1985; Pearsall e Piperno, 1990), ~6.700 anos AP no Peru (Grobman et al., 2012) e ~6.500 anos AP (Brugger et al., 2016), na região das terras baixas amazônicas da Bolivia.

Com base em evidências genômicas, linguísticas, arqueológicas e paleontológicas, a região Sudoeste da Amazônia foi indicada como um provável centro de melhoramento secundário do milho na América do Sul, dentro do qual ocorreu um processo de domesticação parcial da espécie (Kistler et al., 2018). Essa teoria não contradiz a teoria unicêntrica a qual considera que o processo de domesticação se iniciou no México. No entanto, chama a atenção de que o evento de domesticação não estava completo quando o milho se dispersou do México para outras regiões.

Estas evidências reforçam a importância do germoplasma do milho da América do Sul na evolução e diversificação da espécie. O processo de manejo e conservação da espécie realizado pelos agricultores e indígenas, desde os tempos remotos, é um processo contínuo que alcança o presente. O continente sul americano abarca pools gênicos exclusivos, que evoluíram durante milênios. Por este fato, as medidas de conservação da espécie neste continente devem ser prioritárias tanto quanto ocorre na Mesoamérica.

2.3. Genética da domesticação: como o milho foi domesticado e quais foram as consequências?

O milho é uma espécie diploide (2n=20) e o seu genoma apresenta 40.000 genes, em 10 pares cromossomos (Nannas e Dawe, 2015). A espécie apresenta um elevado número de genes duplicados ou quadruplicados, o que pode aumentar as possibilidades de surgir uma variação genética benéfica e diminuir o impacto de uma mutação prejudicial. O genoma da espécie é constituído por 2,3 bilhões de bases de DNA e aproximadamente 85% do mesmo são elementos de transposição (Gore et al., 2009; Schnable et al., 2009; Soderlund et al., 2009; Springer et al., 2009; Vielle-Calzada et al., 2009). Os elementos de transposição, também conhecidos como transposons, são segmentos lineares de DNA capazes de mudar de posição dentro do genoma, independentemente da homologia entre a região onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam (McClintock, 1950).

O processo de domesticação resultou em uma série de mudanças morfológicas entre o teosinto silvestre e o milho cultivado. Estas alterações morfológicas em relação às características originais são definidas como *síndromes da domesticação*. A observação das estruturas intermediárias entre as espécies que ocorrem em sua descendência sugeriram diferentes interpretações sobre a evolução do milho (Figura 3). A intervenção humana foi uma condição indispensável para essa transformação e a origem da espécie cultivada. Estas alterações envolveram desde a mudança da arquitetura da planta (Doebley et al., 1997, 2006; Studer e Doebley, 2012) até características associadas aos órgãos reprodutivos da espécie (Iltis, 1983; Beadle, 1972, 1980; Doebley et al., 1990; Doebley e Stec, 1991; Dorweiler e Doebley, 1997).

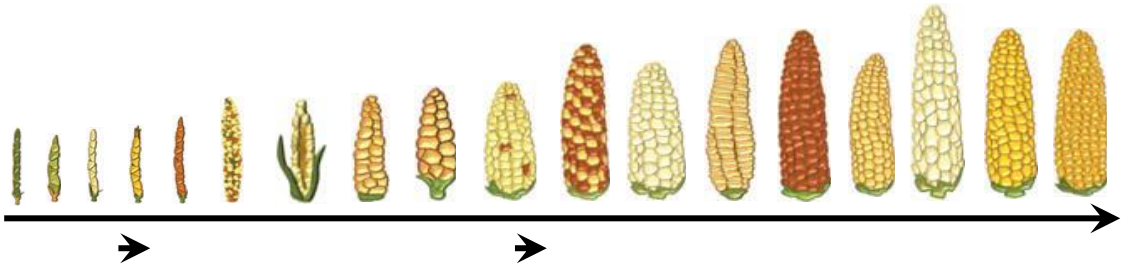

Figura 3. Evolução do milho a partir do teosinto: mudanças estruturais na espiga do milho ao longo do tempo. As espigas do esquema foram extraídas de Kistler et al. (2018).

Segundo a *teoria da transmutação sexual catastrófica* do milho, a inflorescência feminina do milho (espiga) foi derivada da inflorescência masculina do teosinto (pendão). Com base nas hipóteses de Iltis (1983), este fenômeno ocorreu por meio de um processo conhecido como assimilação genética, e não por consequência de uma mutação genética (Iltis, 1983). No entanto, outros estudos complementares constataram que estas diferenças morfológicas entre as inflorescências femininas de milho e teosinto ocorreram devido a uma série de mutações as quais envolveram apenas cinco genes, localizados em quatro cromossomos (Beadle, 1972, 1980; Doebley et al., 1990; Doebley e Stec, 1991; Dorweiler e Doebley, 1997). Este evento alterou a distribuição de nutrientes na planta e causou esta mudança morfológica drástica, que de alguma forma e por algum motivo foi apreendido pela seleção humana (Iltis, 1983).

Em relação à arquitetura da planta, o gene *tb1* (*teosinte branched1*) foi identificado como um QTL (*locos de características quantitativas*) de grande efeito no controle da diferença de dominância apical entre o milho e o teosinto. Este gene pertence à família de reguladores transcricionais, uma classe de genes envolvidos na regulação transcricional dos genes do ciclo celular. O *tb1* controla a ramificação da parte aérea, e reprime o crescimento de meristemas axilares e elongação dos ramos, pelo seu efeito repressor do ciclo celular (Doebley et al., 1997, 2006; Studer e Doebley, 2012). Foi comprovado que houve a inserção de um retroelemento nas seqüências regulatórias do gene *tb1*. O efeito provocado por esta inserção (alteração da arquitetura da planta) foi alvo da seleção humana durante a domesticação do milho a partir de seu parente silvestre, o teosinto. Foi diagnosticado que o alelo de inserção estava presente em baixa frequência nas populações de teosinto antes do processo de seleção (Tsiantis, 2011), o que leva a crer que as plantas que continham este alelo, bem como suas modificações na arquitetura da planta, foram as selecionadas pelo ser humano.

Dentre as diversas consequências do processo de domesticação do milho observamos a transformação de uma espiga pequena do teosinto, com grãos facilmente dispersos, para uma espiga de milho com grande quantidade de grãos fortemente ligados à ráquis. O teosinto apresenta axila com várias folhas, elevada quantidade de espigas pequenas e frágeis, cada espiga com seis a 12 sementes, em uma ou duas fileiras. O milho, por sua vez, apresenta uma ou mais espigas grandes, com muitas fileiras, não frágeis (Hake e Ross-Ibarra, 2015). O Quadro 1 e a Figura 4 apresentam características contrastantes que apontam traços do processo de domesticação do milho.

Quadro 1. Características morfológicas contrastantes do ancestral teosinto e do milho relacionadas ao processo de domesticação do milho.

Teosinto	Milho
Arquitetura: muitos ramos laterais	Arquitetura: um ramo (colmo) principal
1 ou 2 fileiras de grãos	4 ou mais fileiras de grãos
Espiguetas simples	Espiguetas aos pares
Glumas externas duras	Glumas externas macias
Espigas deiscentes	Espigas não deiscentes
Inflorescências laterais masculinas	Inflorescências laterais femininas
Ramos laterais primários longos	Ramos laterais primários curtos

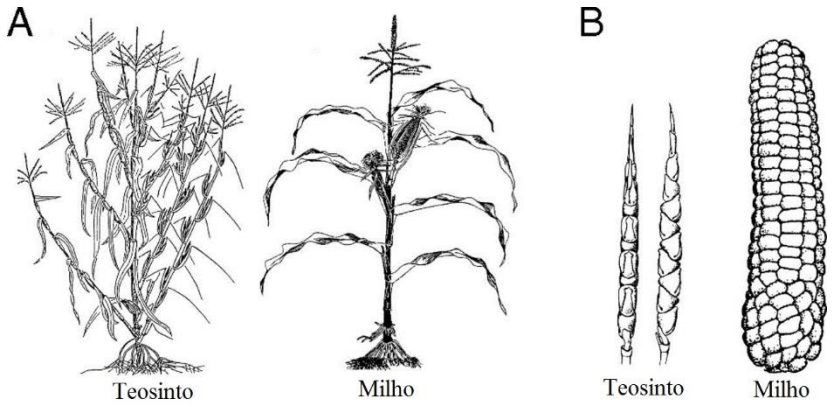

Figura 4. Características morfológicas da planta (A) e da espiga (B) do teosinto e do milho. Fonte: Yang et al. (2019), adaptado de Doebley et al. (1990).

Apesar das diferenças morfológicas, o milho e o teosinto podem se cruzar naturalmente no campo e gerar descendentes férteis. A conservação das espécies de teosinto é relevante e deve ser considerada como uma fonte de diversidade genética para o milho. Além disto, é considerado um germoplasma útil para programas de pré-melhoramento e melhoramento genético que visam introgressão de resistência a fatores bióticos e abióticos (Nault et al., 1982; Cohen e Galinat, 1984). Cruzamentos de teosintos *Z. luxurians e Z. mexicana*, permitiram aumentar a tolerância ao calor e a seca sem afetar significativamente o rendimento de grão (Sanchez, 2011). O germoplasma de *Z. mexicana* também foi incorporado a uma linhagem de milho resultando em linhagens com resistência a diversas doenças da espiga, além disso, os conteúdos de proteína e alguns aminoácidos essenciais aumentaram (Wang et al., 2008). E, para os agricultores, o teosinto é considerado uma forrageira de qualidade para a bovinocultura de leite (Silva et al., 2015).

Os parentes silvestres estão relacionados com as espécies cultivadas, no entanto seguem o processo de evolução, sob seleção natural e menor intervenção humana, e se adaptam a ambientes extremos tal como calor e frio, secas e alagamentos, constituindo um pool gênico em resposta às mudanças climáticas para uso futuro.

2.4. Por que os humanos domesticaram o milho?

Os estudos sobre a domesticação do milho abordaram e forneceram respostas associadas, principalmente, às perguntas "*onde?"*, "*quando?"* e "*como?"* o milho foi domesticado. A pergunta *"por quê?"* a espécie foi domesticada foi menos discutida na literatura científica e, portanto, merece esforços para encontrar respostas, afinal: *"para qual finalidade o milho foi utilizado pelos humanos no processo de domesticação?".*

No processo de domesticação existem dois tipos de seleção que atuam e se complementam: i) *seleção consciente* às características de interesse; e ii) *seleção inconsciente* provocada por mudanças ecológicas em consequência da retirada de plantas de seus ambientes silvestres e transportadas a novos ambientes manejados por humanos, distintos dos locais originais (Zohary, 2004). Neste último caso, geralmente, as mudanças morfológicas das plantas são consideradas de baixo impacto (Rindos, 1984).

Darwin foi o primeiro a levantar a questão de intencionalidade sobre a origem e a domesticação de plantas. Ele usou a terminologia *seleção inconsciente* e *seleção metódica* e sugeriu que os povos "primitivos" praticavam seleção inconsciente e os povos "civilizados" praticavam seleção consciente. A seleção inconsciente foi defendida, principalmente, por muitos cientistas naturais e a seleção consciente por cientistas sociais (Clement et al., 2009). Segundo Zeder (2006), os primeiros atos de domesticação da paisagem e das populações de plantas e animais poderiam ser inconscientes, mas logo que produzissem um efeito positivo, passariam a ser repetidos de forma consciente, justamente porque geraram benefícios.

Para além dos fatores associados à seleção, um dos motivos que tentam explicar o que levou os caçadores-coletores a mudarem o seu estilo de vida e iniciar o processo de domesticação, estão as mudanças climáticas ocorridas no final do Pleistoceno, as quais promoveram a concentração de humanos e animais em áreas férteis isoladas devido à presença local de água. Este evento envolveu a evolução gradual, irregular e independente em distintas espécies de forma sincronizada em diferentes ambientes (Evans, 1993).

A *seleção consciente*, atribuída às características de interesse, ocorre porque a espécie é considerada útil aos humanos por algum motivo. Algumas hipóteses sugeriram que o milho foi uma cultura secundária, ou seja, a cultura não era a principal fonte de alimento, e assim a sua maior dispersão ocorreu antes da espécie se desenvolver como principal cultura cultivada (Blake, 2006; Piperno, 2011). Iltis (2000) sugeriu que o açúcar do colmo da planta foi, inicialmente, mais importante que os grãos. Essa ideia se complementa com os estudos de Smalley e Blake (2003), os quais apontam que o milho foi utilizado primeiramente para produzir bebidas fermentadas e alcóolicas, sendo utilizadas para consumo em rituais, eventos festivos e culturais. Entretanto, a detecção de amido dos grãos em locais de antiga domesticação e a falta de fitólitos do colmo (Piperno et al., 2009) não sustentam estas hipóteses.

Por outro lado, o teosinto possui capacidade de expansão e estoura tal como o milho pipoca. Paterniani et al. (2000) mencionaram a capacidade de expansão do teosinto e consideraram o milho pipoca um dos mais primitivos na escala evolutiva da espécie. A descoberta da capacidade de expansão do grão, seguramente, está associada ao manejo e uso do fogo pelos povos pré-históricos. Outros autores apoiam a teoria de que o milho pipoca provavelmente corresponde ao primeiro e ao menor nível de domesticação da espécie (Wellhausen et al., 1951; Contreras et al., 2006). Piperno et al. (2009) caracterizaram amostras arqueológicas de milho, encontradas na região do Vale do Rio Balsas, no México, que apresentaram características do endosperma do tipo pipoca.

Estas hipóteses se baseiam no fato de que a pipoca ainda apresenta algumas características consideradas “silvestres”, tal como grãos menores, maior prolificidade, presença de perfilho (gene *tb1*), endosperma muito rígido (Ziegler, 2001) e formato de grão pontiagudo, em algumas raças. O seu consumo, inicialmente, supostamente se deu na forma de milho assado ou dos grãos estourados, com o uso do fogo. Além disso, foram identificados fragmentos de palha, espiga e grão de milho pipoca datados de ~6.700 anos AP nos sítios arqueológicos de Paredones e Huaca Prietra, no Peru (Grobman et al., 2012).

Análises genéticas demonstraram que as raças de pipoca *Cristalino de Chihuahua, Palomero de Chihuahua e Palomero* mostraram-se mais próximas geneticamente às populações de teosinto (Matsuoka et al., 2002). Em períodos mais antigos os grãos de milho se assemelhavam aos do tipo pipoca (Brieger et al., 1958; Grobman et al., 2012), surgindo posteriormente os milhos de grão duro, farináceos, dentados (Brieger et al., 1958) e doces. As frações protéicas do grão de milho podem variar de acordo com o tipo de grão em consequência da ação de genes mutantes. Foram descobertos vários genes capazes de modificar o tipo de endosperma (Bjarnason e Vasal, 1992). Segundo Brieger et al. (1958), os diferentes tipos de grão, usos e preferências dos agricultores se relacionam com diferentes etapas do processo de domesticação do milho.

No Brasil e em outros países das terras baixas sul-americanas, os povos indígenas Guarani cultivavam e utilizavam as raças pipocas *Avati Pichingá* e *Avati Pinchigá Ihú* para a alimentação humana em suas aldeias (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977). O uso do milho como pipoca poderia ser uma hipótese a ser considerada no processo inicial de domesticação. A pergunta *“por que?”* o milho foi domesticado ainda permanece sem respostas e merece ser melhor investigada para preencher as lacunas científicas e ampliar o conhecimento sobre os usos do milho na História.

2.5. Dispersão do milho nas Américas: o evento que ampliou a diversidade genética

A data de ocupação humana nas Américas tem sido discutida pela comunidade científica por meio de dados arqueológicos (Prous, 1997; Roosevelt et al., 1996; Goebel et al., 2008), linguísticos (Walker e Ribeiro, 2011; Brown et al., 2014), biológicos e genéticos (Neves et al., 1989; Pena et al., 1989; Neves et al., 2007; Goebel et al., 2008). Estas informações são úteis para estudos evolutivos de espécies de plantas cultivadas. Ao longo de sua dispersão pelo continente, os humanos começaram a utilizar espécies de plantas e selecionar características favoráveis (Harlan, 1971, 1975; Gepts e Debouck, 1991; Pickersgill, 2007; Hilbert et al., 2017; Watling et al., 2018). Considerando que o milho é uma espécie domesticada e sua sobrevivência é totalmente dependente do manejo da espécie humana, sua dispersão para diversas regiões se deu por meio das migrações humanas (Brown et al., 2014).

A dispersão do milho pelo continente americano está associada a processos adaptativos, diversos habitas e contextos socioculturais, o que faz com que esse cereal seja uma cultura com grande variabilidade genética (Brieger et al., 1958). A cultura do milho é considerada uma das mais antigas do novo mundo. As populações de milho em condições parciais de domesticação foram dispersas do centro de origem, em duas direções. A primeira iniciou-se no México, seguindo pelo Oeste e Norte do país, passando pelo Sudoeste e Leste dos Estados Unidos (Hart et al., 2007), e continuou até o Leste do Canadá (Vigouroux et al., 2008). A segunda via se deu pelas terras altas do México até o Oeste e Sudoeste das terras baixas, seguindo pela

Guatemala, até chegar à América do Sul. Amostras arqueológicas foram encontradas há ~7.500 anos AP no Panamá (Piperno et al., 1985). Registros arqueológicos indicaram que a espécie alcançou as terras baixas da América do Sul há pelo menos ~7.150 anos AP no Equador (Stothert, 1985; Pearsall e Piperno, 1990), ~6.700 anos AP no Peru (Grobman et al., 2012) e ~6.500 anos AP, na região Sudoeste da Amazônia, no Lago Rogaguado, Bolivia (Brugger et al., 2016).

Estudos genético-evolutivos, realizados por meio de amostras modernas e arqueológicas de milho, sugeriram que houveram diferentes ondas introdutórias de milho na América do Sul, em diferentes épocas. A dispersão do milho ao longo dos Andes ocorreu independente da dispersão das terras baixas do continente (Freitas, 2001; Freitas et al., 2003; Freitas e Bustamante, 2013). Estes estudos demonstraram que o processo de dispersão da espécie no continente sul americano contribuiu para a divisão dos dois maiores grupos genéticos do milho, o grupo andino e outro das terras baixas da América do Sul (Matsuoka et al., 2002; Vigouroux et al., 2008; van Heerwaarden et al., 2011). Os padrões "terras altas" e "terras baixas", de modo geral, apresentaram-se bem estabelecidos em suas regiões originais. Este isolamento de padrões ocorreu, sobretudo, devido a barreiras culturais referentes às populações humanas (Freitas et al., 2003; Freitas e Bustamante, 2013; Kistler et al., 2018).

Os registros linguísticos mais antigos na América do Sul para o milho foram de ~5.000 anos AP, envolvendo a região amazônica. A família linguística indígena Arawak é a maior do continente sul americano e apresenta grande expansão na região Norte do Brasil e nas regiões adjacentes (Walker e Ribeiro, 2011; Aikhenvald, 2013). Este grupo foi o primeiro a considerar a cultura do milho como muito importante (Brown et al., 2014). Os Arawaks se dispersaram a partir da Amazônia Ocidental ao longo das terras baixas, em diferentes épocas, a partir de um ponto originário no Oeste da Amazônia em diferentes direções: Norte, Sul e Centro do país (Walker e Ribeiro, 2011; Aikhenvald, 2013) (Figura 5). Partindo do princípio de que o milho foi adotado por este grupo indígena em tempos remotos, a dispersão mais antiga da espécie, na região, muito provavelmente ocorreu junto à expansão Arawak e pelo intercâmbio entre grupos humanos ao longo do continente.

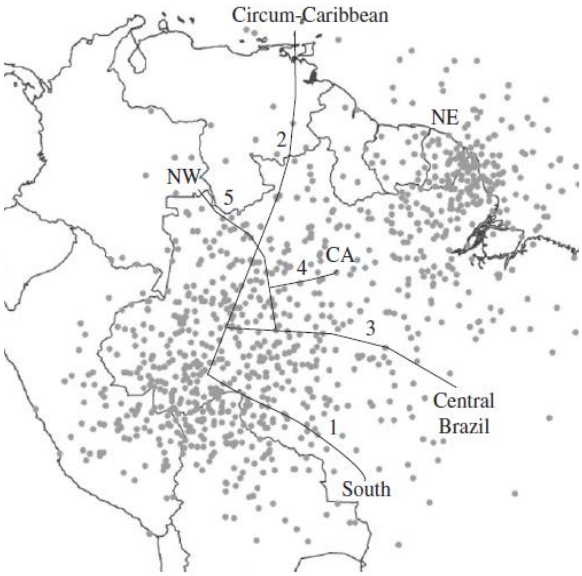

Figura 5. Migração do grupo indígena Arawak nas terras baixas da América do Sul, baseado no modelo linguístico proposto por Walker e Ribeiro (2011).

Outros registros linguísticos foram observados de ~3.000 anos AP, no Mato Grosso; e de ~2.000 anos AP, no Sul do Brasil (Brown et al., 2014). Em Rondônia, foram datados de ~2.000 anos AP, onde foi concentrada a presença de cinco grupos indígenas diferentes, incluindo os Tupis-guaranis (Brown et al., 2014).

Com a descoberta da América, os colonizadores europeus tomaram contato pela primeira vez com o milho (Paterniani, 1998; Mir et al., 2013) e passaram a cultivar diferentes raças antigas da espécie (Paterniani e Goodman, 1977; Paterniani, 1998). O milho só passou a ser conhecido pelos europeus quando Colombo retornou a Europa, levando consigo o milho encontrado em Cuba. Posteriormente, alcançou a África e a Ásia até conquistar o comércio global (Mir et al., 2013). Ao longo dos anos, o Brasil recebeu imigrantes de muitos países e diversas sementes foram introduzidas no território, tal como sementes de milho dentado trazidas por imigrantes após a Guerra de Secessão dos Estados Unidos, por volta de 1868. A mistura entre as variedades nativas e introduzidas gerou novas variedades de milhos dentados e semi-dentados (Paterniani, 1998).

O processo de dispersão do milho esteve e está associado ao surgimento de centros de diversificação da espécie em diferentes contextos ambientais e socioculturais. Os centros de diversidade devem ser vistos como centros de acumulação de germoplasma e de domesticação *in situ* (Harlan, 1992). A existência desses centros de diversidade foi ocasionada pela hibridação entre populações, manejo e seleção pelo ser humano em ambientes diversos (Kato et al., 2009). Os agricultores são os principais protagonistas neste processo uma vez que estão inseridos a sistemas dinâmicos de manejo capazes de selecionar, modificar e incrementar a diversidade de variedades locais de milho ao longo do tempo (Louette et al., 1997; Louette e Smale, 2000). A variabilidade genética permite uma maior adaptação dos cultivos às mudanças climáticas globais e constitui a base genética para agricultores familiares. Além disso, a variabilidade garante a segurança alimentar e incorpora valores sociais e culturais.

As regiões de Chiapas, Mesa Central e Sierra Madre Ocidental são indicadas como centros de diversidade genética de milho no México (Kato et al., 2009). A Bolívia e o Peru apresentam o maior número de raças de milho catalogadas da América, com 77 e 66 raças, respectivamente, superando o México (65 raças), centro de origem da espécie (Serratos, 2009). As terras baixas da América do Sul, regiões com altitude abaixo de 1500 metros, as quais envolvem o Brasil e áreas adjacentes (Argentina, Uruguai, Paraguai, terras baixas da Bolívia e as Guianas) são consideradas um centro secundário de diversidade de milho, com 19 raças e 23 sub-raças (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977).

No âmbito microrregional, foi identificado um micro-centro de diversidade de milho localizado no Sul do Brasil, na região do Extremo Oeste do estado de Santa Catarina, o qual envolve uma área de ~ 558.646 km^2 (Costa et al., 2017). Os micro-centros de diversidade estão relacionados a áreas geográficas muito restritas, dentro dos quais é acumulada significativa diversidade (Harlan, 1971, 1992). O centro de diversidade 'Brasil/Paraguai', proposto por Vavilov, o qual envolve esta região, está associado à elevada densidade populacional de índios Guarani no passado (Vavilov, 1992). Os indígenas Guarani são conhecidos por cultivarem, principalmente, variedades de milho pipoca (Paterniani e Goodman, 1977). Esta região, no sul do Brasil, apresentou um elevado número de variedades locais de milho (1.513, no total), associado a uma expressiva riqueza de características morfológicas do grão, usos, origem, tempo de conservação (Costa et al., 2017) e, também pela presença de parentes silvestres pertencentes à espécie de

teosinto *Zea luxurians* (Silva et al., 2015). É provável que existam outros micro-centros de diversidade de milho em outras regiões das terras baixas da América do Sul, o que reforça a importância da realização de novas pesquisas que tenham como objetivo a identificação de outras microrregiões com importante diversidade nesta amplitude geográfica.

A diversidade genética de variedades locais de milho foi caracterizada em distintas regiões, considerando características: i) morfológicas (Brieger et al., 1958, Louette et al., 1997; Carvalho et al., 2008; Costa et al., 2017; Silva et al., 2017); ii) moleculares (Matsuoka et al., 2002; Vigouroux et al., 2008; van Heerwaarden et al., 2011; Silva et al., 2015; Kistler et al., 2018); iii) etnobotânicas (Bellon e Brush, 1994; Louette et al., 1997; Louette e Smale, 2000; Costa et al., 2017); iv) bioquímicas (Kuhnen et al., 2009, 2010a,b, 2011, 2012; Uarrota et al. 2011a,b); e v) citogenéticas (McClintock et al., 1981; Poggio et al., 1998; Realini et al., 2018). Em Cuzapala, no México, as variedades brancas estavam associadas aos usos gastronômicos, as variedades roxas foram consideradas mais doces e, geralmente, consumidas assadas na fase leitosa do grão, enquanto que as variedades amarelas associaram-se, principalmente, à alimentação animal (Louette et al., 1997). No Arquipélogo da Madeira, variedades locais de milho foram caracterizadas por meio de descritores morfológicos e reprodutivos. As análises identificaram a formação de quatro grupos associados à cor do grão. Observou-se a predominância do tipo de grão duro e as cores variaram do branco ao amarelo, e raramente vermelho (Carvalho et al., 2008). No micro-centro de diversidade de milho identificado no Sul do Brasil, os resultados também demonstraram que a riqueza de usos associados aos grupos morfológicos das variedades crioulas. Foram identificados 59 grupos morfológicos distintos, aos quais são atribuídas características do grão como tipo de endosperma, cor e tamanho do grão (Costa et al., 2017).

Uma caracterização molecular realizada, por meio de marcadores RAPD, em 81 variedades do Sul do Brasil (oriundas principalmente do estado do Paraná), diagnosticou dois grandes grupos genéticos, os quais associaram-se à cor e tipo de grão (Carvalho et al., 2004). A cor do grão destas variedades associou-se também ao uso pelos agricultores, uma vez que as variedades brancas foram indicadas para a fabricação de farinha e para o consumo humano, e as variedades amarelas para a alimentação animal, principalmente.

Variedades locais de milho foram caracterizadas por meio de marcadores microssatélites (SSR) (Matsuoka et al., 2002; Vigouroux et al., 2008) e *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) (van Heerwaarden et al., 2011; Kistler et al., 2018). Estas pesquisas estudaram a relação da diversidade genética do milho e região de origem geográfica para elucidar aspectos de evolução, domesticação e dispersão da espécie no continente americano.

A identificação de regiões de diversidade pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias e indicação de áreas prioritárias para conservação. A evolução das variedades locais de milho em regiões geográficas com características edafoclimáticas, de relevo e altitude diferentes daquelas encontradas em seu centro de origem pode contribuir para ampliar a diversidade e o pool gênico do milho. O entendimento sobre o processo de dispersão e a identificação de áreas de diversidade, bem como a caracterização das variedades locais, é relevante uma vez que permite delinear estratégias de conservação e o uso dos recursos genéticos da espécie.

REFERÊNCIAS

Aikhenvald, A.Y. (2013) Amazonia: linguistic history. In: Ness, I., Bellwood, P. (eds.) The Encyclopedia of Global Human Migration. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, pp. 384-391.

Beadle, G.W. (1972) The mystery of maize. *Field Museum of Natural History Bulletin* 43:2-11.

Beadle, G.W. (1980) The ancestry of corn. *Science American* 242:112-119.

Bellon, M.R.; Brush, S.B. (1994) Keepers of maize in Chiapas, Mexico. *Economic Botany* 48(2):196-209.

Bjarnason, M.; Vasal, S.K. (1992) Breeding of quality protein maize (QPM). *Plant Breeding Reviews* 9(2):181-216.

Blake, M. (2006) Dating the initial spread of *Zea mays*. In: Staller, J.E.; Tykot, R.H.; Benz, B.F. (Eds.) Histories of maize: multidisciplinary approaches to the prehistory, biogeography, domestication, and evolutions of maize. Elsevier, San Diego, pp. 55-72.

Brieger, F.G.; Gurgel, J.T.A.; Paterniani, E.; Blumenchein, A.; Alleoni, M.R. (1958) Races of maize in Brazil and other eastern South American Countries. National Academic of Sciences, Washington DC.

Brown, C.H.; Clement, C.R.; Epps, P.; Luedeling, E.; Wichmann, S. (2014) The paleobiolinguistics of maize (*Zea mays* L.). *Ethnobiology* 5:52-64.

Brugger, S.O.; Gobet, E.; van Leeuwen, J.F.N.; Ledru, M.P.; Colombaroli, D.; van der Knaap, W.O.; et al. (2016) Longterm man-environment interactions in the Bolivian Amazon: 8000 years of vegetation dynamics. *Quaternary Science Reviews* 132:114-128.

Bush, M.B.; Piperno, D.R.; Colinvaux, P.A. (1989) A 6,000 year history of Amazonian maize cultivation. *Nature* 340:303-305.

Carvalho, V.P.; Ruas, C.F.; Ferreira, J.M.; Moreira, R.M.P.; Ruas, P.M. (2004) Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 27(2):228-236.

Carvalho, M.A.P.; Ganança, J.F.T.; Abreu, I.; Sousa, N.F.; dos Santos, T.M.M.; Vieira, M.R.C.; Motto, M. (2008) Evaluation of the maize (*Zea mays* L.) diversity on the Archipelago of Madeira. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:221-233.

Camacho-Villa, T.C.; Maxted, N.; Scholten, M.; Ford-Lloyd, B. (2006) Defining and identifying crop landraces. *Plant Genetic Resources* 3:373-384.

Clement, C.R. (1999) 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. *Economic Botany* 53:188-202.

Clement, C.R.; Cole, D.M.; Vivan, J.L. (2007) Conservação on farm. In: Nass, L.L. (Ed.). Recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasilia, pp.511-544.

Clement, C.R.; Borém, A.; Lopes, M.T.G. (2009) Da domesticação ao melhoramento de plantas. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R. (Org). Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas. UFV, Viçosa, pp.11-38.

Cohen, J.I.; Galinat, W.C. (1984) Potential use of alien germplasm for maize improvement. *Crop Science* 24:1011-1015.

Contreras, T.R.; Díaz, L.G.; Reyes, G.R. (2006) Geografia e historia cultural del maíz palomero tolqueño. *Ciencia Ergo Sum* 13:47-56.

Costa, F.M.; Silva, N.C.A.; Ogliari, J.B. (2017) Maize diversity in southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 64(4):681–700.

Diamond, J. (1997). Guns, germs and steel: The fates of human societies. W.W. Norton, New York. 480p.

Doebley, J.F. (1990) Molecular systematics of *Zea* (Gramineae).*Maydica* 35:143-150

Doebley, J.F.; Iltis, H. H. (1980) Taxonomy of *Zea* (Gramineae) I. A subgeneric classification with key to taxa. *American Journal of Botany* 67:982-993.

Doebley, J.F.; Stec, A. (1991) Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics* 129:285-295.

Doebley, J.F.; Stec, A.; Wendel, J.; Edwards, M. (1990) Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: Implications for the origin of maize. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 87:9888-9892.

Doebley, J.F.; Stec, A.; Hubbard, L. (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386:485-488.

Doebley, J.F.; Gaut, B.S; Smith, B.D. (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127:1309-1321.

Dorweiler, J.E.; Doebley, J.F. (1997) Developmental analysis of teosinte glume architecture 1: A key locus in the evolution of maize (Poaceae). *American Journal of Botany* 84:1313-1322.

Evans, L.T. (1993) The domestication of crop plants. In: Evans, L.T. Crop evolution, adaptation and yield. Cambridge University Press, Cambridge, pp.32-112.

Freitas, F.O. (2001) Estudo genétivo-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays mays*, L.) e feijão (*Phaseolus vugaris*, L.). Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo.

Freitas, F.O.; Bustamante, P.G. (2013) Amazonian maize: diversity, spatial distribution and historical-cultural diffusion. *Tipití: Journal of the Society for the Anthropology of Lowland South America* 11(2):60-65.

Freitas, F.O.; Bandel, G.; Allaby, R.G.; Brown, T.A. (2003) DNA from primitive maize landraces and archaeological remains: implications for the domestication of maize and its expansion into South America. *Journal of Archaeological Science* 30:901-908.

Fukunaga, K.; Hill, J.; Vigouroux, Y.; Matsuoka, Y.; Sanchéz, J.G.; Liu, K.; Buckler, E. S.; Doebley, J.F. (2005) Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetic Society of America* 169:2241-2254.

Gepts, P.; Debouck, D. (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*)". In: Schoonhoven, A.; Voysest, A. (Eds.) Commom Beans – Research for crop improvement. CIAT, Cali, pp.7-53.

Goebel, T.; Waters, M.R.; O'rourke, D.H. (2008) The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. *Science* 319:1497-1502.

Gore, M.A.; Chia, J.M.; Elshire, R.J.; Sun, Q.; Ersoz, E.S.; et al. (2009) A first-generation haplotype map of maize. *Science* 326:1115-1117.

Grobman, A.; Bonavia, D.; Dillehay, T.D.; Piperno, D.R.; Iriarte, J.; Holst, I. (2012) Preceramic maize from Paredones and Huaca Prieta, Peru. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 109:1755-1759.

Hake, S.; Ross-Ibarra, J. (2015) Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. *eLife* 4:e05861.

Harlan, J.R. (1971) Agricultural origins: centers and noncenters. *Science* 174: 468-173.

Harlan, J.R. (1992) Crops and man. American Society of Agronomy/Crop Science Society of America, 2ed., Madison, Wisconsin.

Hart, J.P.; Brumbach, H.J.; Lusteck, R. (2007) Extending the phytolith evidence for early maize (*Zea mays* ssp. *mays*) and squash (*Cucurbita* sp.) in Central New York. *American Antiquity* 72:563-583.

Hilbert, L.; Neves, E.G.; Pugliese, F.; Whitney, B.S.; Shock, M.; Veasey, E.; Zimpel, C.A.; Iriarte, J. (2017) Evidence for mid-Holocene rice domestication in the Americas. *Nature Ecology & Evolution* 1:1693-1698.

Iltis, H.H. (1983) "From teosinte to maize: The catastrophic sexual transmutation". *Science* 222:886-894.

Iltis, H.H. (2000) Homeotic sexual translocations and the origin of maize (*Zea mays*, Poaceae): A new look at an old problem. *Economic Botany* 54:7-42.

Kato, T.A. (2005). Cómo y dónde se originó el maíz. *Investigación y Ciencia* 347:68- 72.

Kato, T.A.; Mapes, C.; Mera, L.M.; Serratos, J.A.; Bye, R.A. (2009) Origen y diversificacion del maiz: una revision analítica. (1st ed.). Universidad Autónoma de México, Ciudad de México.

Kistler, L.M.; Maezumi, S.Y.; de Souza, J.G.; Przelomska, N.A.S.; Costa, F.M.; Smith, O.; Loiselle, H.; Ramos-Madrigal, J.; Wales, N.; Ribeiro, E.; Grimaldo, C.; Prous, A.P.; Gilbert, M.; Thomas P.; de Oliveira, F.F.; Allaby, R.G. (2018) Multi-proxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. *Science* 362:1309-1313.

Kuhnen, S.; Lemos, P.M.M.; Campestrini, L.; Ogliari, J.B.; Dias, P.F.; Maraschin, M. (2009) Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. *Journal of Functional Foods* 1:284-290.

Kuhnen, S.; Ogliari, J.B.; Dias, P.F.; Boffo, E.F.; Correia, I.; Ferreira, A.G.; Delgadillo, I.; Maraschin, M. (2010a) ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. *International Journal of Food Science & Technology* 45:1673-1681.

Kuhnen, S.; Ogliari, J.B.; Dias, P.F.; Santos, M.S.; Ferreira, A.G.; Bonham, C.C.; Wood, K.V.; Maraschin, M. (2010b) Metabolic fingerprint of brazilian maize landraces silk (stigma/styles) using nmr spectroscopy and chemometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:2194-2200.

Kuhnen, S.; Lemos, P.M.M.; Campestrini, L.H.; Ogliari, J.B.; Dias, P.F.; Maraschin, M. (2011) Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9):1548-1553.

Kuhnen, S.; Dias, P.F.; Ogliari, J.B.; Maraschin, M. (2012) Brazilian maize landraces silks as source of lutein: an important carotenoid in the prevention of age-related macular degeneration. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 3:1609-1614.

Louette, D.; Smale, M. (2000) Farmers' seed selection practices and traditional maize varieties in Cuzalapa, Mexico. *Euphytica* 113: 25-41.

Louette, D.; Charrier, A.; Berthaud, J. (1997) In situ conservation of maize in Mexico: genetic diversity and maize seed management in a traditional community. *Economic Botany* 51:20-38

Matsuoka, Y.; Vigouroux, Y.; Goodman, M. M.; Sánchez, J. J.; Buckler, E.; Doebley, J. F. (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:6080-6084.

McClintock, B. (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 36(6):344-355.

McClintock, B.; Kato, T.A.; Blumenschein, A. (1981) Chromosome constitution of races of maize. Colegio de Postgraduados, Chapingo.

Mir, C.; Zerjal, T.; Combes, V.; Dumas, F.; Madur, D.; Bedoya, C.; Dreisigacker, S.; Franco, J.; Grudloyma, P.; Hao, P. X.; Hearne, S.; Jampatong, C.; Laloë, D.; Muthamia, Z.; Nguyen, T.; Prasanna, B. M.; Taba, S.; Xie, C. X.; Yunus, M.; Zhang, S.; Warburton, M. L.; Charcosset, A. (2013) Out of America: tracing the genetic footprints of the global diffusion of maize. Theoretical and Applied Genetics, 126:2671–2682.

Montanari, M. (2008) Comida como cultura. Ed. Senac, São Paulo.

Nannas, N.J.; Dawe, R.K. (2015) Genetic and genomic toolbox of *Zea mays. Genetics* 199:655-669.

Nault, L.R.; Gordon, D.T.; Damsteegt, V.D.; Iltis, H.H. (1982) Response of annual and perennial teosintes (*Zea*) to six maize viruses. *Plant Disease* 66:61-62.

Neves, W.; Zanini, M.D.C.; Munford, D.; Pucciarelli, H.M. (1989) O povoamento das Américas à luz da morfologia craniana. *Revista USP*, 34:96-105.

Neves, W.A.; Bernardo, D.V.; Okumura, M.M.M. (2007) A origem do homem americano vista a partir da América do Sul: uma ou duas migrações? *Revista de Antropologia* 50(1):9-44.

Paterniani, E. (1998) Diversidade genética e raças de milho no Brasil. In: Soares, A.C.; Machado, A.T.; Silva, B.M.; Weid, J.M.V.D. (Eds.) Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade. AS-PTA, Rio de Janeiro, 185p.

Paterniani, E.; Goodman, M.M. (1977) Races of maize in Brazil and adjacent areas. CIMMYT, Mexico City.

Paterniani, E.; Nass, L.L.; Santos, M.X. (2000) O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil. In: Udry, C.V.; Duarte, W. (Eds.) Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos. Paralelo, Brasília, pp.11-41.

Pearsall, D.M.; Piperno, D.R. (1990) Antiquity of maize cultivation in ecuador: summary and reevaluation of the evidence source. *American Antiquity* 55:324-337.

Pena, S.D.J.; Silva, D.R.C.; Santos, F.R. (1989) Utilização de polimorfismos de DNA do cromossomo Y no estudo do povoamento das Américas. *Revista USP* 34:44-57.

Pickersgill, B. (2007) Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100:925-940.

Piperno, D.R. (2011) The origins of plant cultivation and domestication in the new world tropics: patterns, process, and new developments. In: Price, D.; Bar-Yosef, O. (Eds). The beginnings of agriculture: new data, new ideas. *Current Anthropology* 52:453-470.

Piperno, D.R.; Clary, K.H.; Cooke, R.G.; Ranere, A.J.; Weiland, D. (1985) Preceramic maize in central Panama: phytolith and pollen evidence. *American Anthropologist* 87:871-878.

Piperno, D.R.; Ranere, A.J.; Holst, I.; Iriarte, J.; Dickau, R. (2009) Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5019-5024.

Poggio, L.; Rosato, M.; Chiavarino, A.M.; Naranjo, C.A. (1998) Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Annals of Botany* 82:107-115.

Prous A (1997) O povoamento da América visto do Brasil: uma perspectiva crítica. *Revista USP* 34:8-21.

Ramos-Madrigal, J.; Smith, B.D.; Moreno-Mayar, J.V.; Gopalakrishnan, S.; Ross-Ibarra, J.; Gilbert, M.T.P.; Wales, N. (2016) Genome sequence of a 5,310-year-old maize cob provides insights into the early stages of maize domestication. *Current Biology* 26:3195-3201.

Realini, M.F.; Poggio, L.; Cámara Hernández, J.; González, G.E. (2018) Exploring karyotype diversity of Argentinian Guaraní maize landraces: Relationship among South American maize. *PLoS ONE* 13(6):e0198398.

Rindos, D. (1984) The evolution of domestication. In: Rindos, D. The origins of agriculture: an evolutionary perspective. Academic Press, San Diego, pp.138-189.

Roosevelt, A.C.; Costa, M.L.; Machado, C.L.; Michab, M.; Mercier, N.; Valladas, H.; et al. (1996) Paleoindian cave dwellers in the Amazon: The peopling of the Americas. *Science* 272:373-383.

Sanchez, J.; De La Cruz, L.L.; Vidal, M.V.A.; Ron, P.J.; Taba, S.; Santacruz-Ruvalcaba, F.; et al. (2011) Three new teosintes (*Zea* spp., Poaceae) from México. *American Journal of Botany* 98:1537-1548.

Serratos, J.A. (2009) The origin and diversity of maize in the American continent. Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico, Mexico, p.36.

Schnable, P. S.; Ware, D.; Fulton, R.S.; Stein, J.C.; Wei, F.; Pasternak, S.; et al. (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112-1115.

Silva, N.C.A. (2015) Conservação, diversidade e distribuição de variedades locais de milho e seus parentes silvestres no Extremo Oeste de Santa Catarina, Sul do Brasil. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina.

Silva, N.C.A.; Vidal, R.; Costa, F.M.; Vaio, M.; Ogliari, J.B.O. (2015) Presence of *Zea luxurians* populations (Durieu and Ascherson) Bird in southern Brazil: implications for the conservation of wild relatives of maize. *PloS ONE*. Doi: 10.1371/journal.pone.0139034.

Silva, N.C.A.; Vidal, R.; Ogliari, J.B. (2017) New popcorn races in a diversity microcenter of *Zea mays* L. in the Far West of Santa Catarina, Southern Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution* 64**:** 1191-1204.

Smalley, J.; Blake, M. (2003) Sweet beginnings: stalk sugar and the domestication of maize. *Current Anthropology* 44:675-703.

Soderlund, C.; Descour, A.; Kudrna, D.; Bomhoff, M.; Boyd, L.; Currie, J.; et al. (2009) Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs. *PLoS Genetics* 5(11):e1000740.

Springer, N.M.; Ying, K.; Fu, Y.; Ji, T.; Yeh, C. T.; Jia, Y.; et al. (2009) Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content. *PLoS Genetics* 5(11):e1000734.

Stothert, K.E. (1985) The preceramic Las Vegas culture of Coastal Ecuador. *American Antiquity* 50(3):613-637.

Studer, A; Doebley, J.F. (2012) Evidence for a natural allelic series at the maize domestication locus teosinte branched1. *Genetics* 191:951-958.

Tsiantis, M. (2011) A transposon in *tb1* drove maize domestication. *Nature Genetics* 43:1048-1050.

Uarrota, V.G.; Severino, R.B.; Maraschin, M. (2011a) Maize landraces (*Zea mays* L.): a new prospective source for secondary metabolite production. *International Journal of Agricultural Research* 6:218-226.

Uarrota, V.G.; Schmidt, E.C.; Bouzon, Z.L.; Maraschin, M. (2011b). Histochemical analysis and protein content of maize landraces (*Zea mays* L.). *Journal of Agronomy* 10:92-98.

USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. Corn Area, Yield, and Production. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Access on: 02 May 2018.

Vallebueno-Estrada, M.; Rodriguez-Arévalo, I.; Rougon-Cardoso, A.; González, J.M.; Cook, A.G.; Montiel, R.; Vielle-Calzada, J.P. (2016) The earliest maize from San Marcos Tehuacán is a partial domesticate with genomic evidence of inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:14151-14156.

van Heerwaarden, J.; Doebley, J.; Briggs, W.H.; Glaubitz, J.C.; Goodman, M.M. (2011) Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(3):1088-1092.

Vavilov, N.I. (1992) Origin and geographic of cultivated plants. Cambridge University Press, Cambridge, p. 497.

Vielle-Calzada, J.P.; de la Veja, O.M.; Hernandez-Guzmán, G.; Ibarra-Laclette, E.; Alvarez-Mejia, C.; Veja-Arreguin, J.C.; et al. (2009) The palomero genome suggests metal effects on domestication. *Science* 326:1078.

Vigouroux, Y.; Glaubitz, J.; Matsuoka, Y.; Goodman, M.M.; Sánchez, G.J.; Doebley, J.F. (2008) Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microstellites. *American Jornal of Botany* 95:1240-1253.

Walker, R.S.; Ribeiro, L.A. (2011) Bayesian phylogeography of the Arawak expansion in lowland South America. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 2562-2567.

Wang, L.; Yang, A.; He, C.; Qu, M.; Zhang, J. (2008) Creation of new maize germplasm using alien introgression from *Zea mays* ssp. *mexicana. Euphytica* 164: 789-801.

Watling, J.; Shock, M.P.; Mongelo, G.Z.; Almeida, F.O.; Kater, T.; De Oliveira, P.E.; et al. (2018) Direct archaeological evidence for Southwestern Amazonia as an early plant domestication and food production centre. *PLoS ONE* 13(7): e0199868.

Wellhausen, E.J.; Roberts, L.M.; Hernández, X.E. (en colaboración con Mangelsdorf, P.C.) (1951) Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. Folleto Técnico No. 5. Oficina de Estudios Especiales. Secretaria de Agricultura y Ganadería. México, D.F, pp.23-47.

Yang, C.J.; Samayoa, L.F.; Bradbury, P.J.; Olukolu, B.A.; Xue, W., York, A.M. et al. (2019) The genetic architecture of teosinte catalyzed and constrained maize domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 116:5643-5652.

Zeder, M.A. (2006) Central questions in the domestication of plants and animals. *Evolutionary Anthropology* 15:105-117.

Zeven, A.C. (1998) Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica* 104:127-139.

Ziegler, K.E. (2001) Popcorn. In: Hallauer, A.R. (Ed.) Specialty corns. CRC Press, Boca Rato, Florida, pp.205-240.

Zohary, D. (2004) Unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Economic Botany* 58:5-10.

3. PADRÕES DE DISPERSÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO MILHO NAS TERRAS BAIXAS DA AMÉRICA DO SUL

RESUMO

As terras baixas da América do Sul surgem com notável importância no processo evolutivo do milho, devido a novas evidências que sugerem que o milho se dispersou do México e chegou nesta região em estado parcial de domesticação. O objetivo desta pesquisa foi estudar os padrões de dispersão da diversidade genética do milho nesta porção do continente. Foram caracterizados 184 acessos de milho do Brasil e Uruguai por meio de 5.313 marcadores moleculares de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), obtidos pela técnica de *Diversity Arrays Technology* (DArTseq). Os acessos foram caracterizados quanto ao tipo de endosperma e associados às famílias linguísticas indígenas relacionadas às respectivas regiões de origem. A diversidade genética foi avaliada por meio da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), análise de agrupamento (método *Neighbor-Joining* e distância genética de Nei), estruturação genética sugerida pelo *software* ADMIXTURE e distintos parâmetros de diversidade. Foram identificados quatro grupos genéticos pela DAPC e seis grupos pela análise de agrupamento, compatível ao número de grupos indicados pelo ADMIXTURE. Os grupos se estruturaram pela predominância de tipos de endosperma específicos: pipoca; duro e semi-duro; farináceo; e farináceo associado à raça *Entrelaçado*. A análise de agrupamento identificou padrões de conexão inter-regional, os quais sugeriram movimentos de dispersão. Os padrões genéticos regionais foram associadas aos registros arqueológicos da espécie e às migrações humanas Arawak e Tupi, o que permitiu sugerir as hipóteses de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul. A partir de um ponto originário no Sudoeste da Amazônia surgiram diferentes rotas migratórias que se dispersaram para o interior e sul do continente. A presente pesquisa ainda sugere a hipótese de dois potenciais centros de diversificação do milho nas terras baixas da América do Sul, que envolvem o Sudoeste da Amazônia e a região do Pampa do Brasil e Uruguai.

Palavras-chaves: migração, variedades locais, *Zea mays* ssp. *mays*, centro de diversificação, variabilidade genética, marcadores SNPs.

Dispersion patterns on the genetic diversity of maize in the lowlands of South America

ABSTRACT

The lowlands of South America arise with remarkable importance in the evolutionary process of maize, due to new evidence that suggests that maize dispersed from Mexico and arrived in this region in a partial state of domestication. The objective of this research was to study the dispersion patterns of the genetic diversity of maize in this portion of the continent. A total of 184 maize accessions from Brazil and Uruguay were characterized by 5,313 single nucleotide polymorphisms (SNPs), obtained by the Diversity Arrays Technology (DArTseq) technique. The accessions were characterized as to the type of endosperm and associated with indigenous language families related to the respective regions of origin. Genetic diversity was assessed using Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC), cluster analysis (Neighbor-Joining method and Nei's genetic distances), genetic structure suggested by ADMIXTURE software and different diversity parameters. Four genetic groups were identified in the DAPC and six groups in the cluster analysis, compatible with the number of groups indicated by the ADMIXTURE. The groups were structured by the predominance of specific types of endosperm: popcorn; flint and semi-flint; floury; and floury associated with the *Entrelaçado* race. The cluster analysis identified interregional connection patterns, which suggested dispersion movements. The regional genetic patterns were associated with the archaeological records of the species and with the Arawak and Tupi human migrations, suggesting the hypotheses of maize dispersion in the lowlands of South America. From a point of origin in the Southwest of the Amazon, different migratory routes emerged and dispersed to the interior and south of the continent. The research also suggests the hypothesis of two potential maize diversification centers in the lowlands of South America, which involve the Southwest of the Amazon and the Pampa region of Brazil and Uruguay.

Keywords: migration, landraces, *Zea mays* ssp. *mays*, center of diversification, genetic variability, SNPs markers.

3.1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* ssp. *mays* L.) apresenta grande importância econômica e sociocultural no mundo. Pesquisas científicas recentes demonstraram que o processo de domesticação da espécie foi mais complexo do que se pensava (Vallebueno-Estrada et al., 2016; Ramos-Madrigal et al., 2016) e sugeriram que o milho se dispersou do México e chegou nas terras baixas da América do Sul em estado parcial de domesticação (Kistler et al., 2018). Estas evidências sugerem que o germoplasma de milho das terras baixas sul americanas constitui um pool gênico importante para o estudo dos processos evolutivos da espécie. A dispersão do milho pelas Américas está associada a um grande número de modificações adaptativas, o que faz com que esse cereal seja uma cultura com grande variabilidade genética (Brieger et al., 1958). Este histórico de migração da espécie para diferentes regiões permitiu o surgimento de centros de diversificação da espécie, em diferentes ecorregiões. A região das terras baixas da América do Sul, a qual abarca áreas com altitudes inferiores a 1.500 m (72% do continente sul americano), é considerada centro secundário de diversidade genética do milho (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977). No entanto, distintos estudos que avaliaram a diversidade genética da espécie realizados até agora envolveram uma amostragem reduzida de acessos de milho desta zona (Matsuoka et al., 2002; Freitas et al., 2003; Vigouroux et al., 2008; van Heerwaarden et al., 2011; Freitas e Bustamante, 2013; Bustamante et al., 2014; Bedoya et al., 2017; Kistler et al., 2018), o que sugere a necessidade de prospecção e caracterização do milho da região. O objetivo desta pesquisa foi estudar os padrões de dispersão da diversidade genética do milho nesta porção do continente.

O processo de domesticação do milho se originou a partir de populações de *Zea mays* ssp. *parviglumis*, no sul do México, há aproximadamente 9000 anos antes do presente (AP) (Matsuoka et al., 2002; Piperno et al., 2009). Um estudo recente sugeriu que o milho chegou nas terras baixas da América do Sul em estado parcial de domesticação (Kistler et al., 2018), onde sua diversificação continuou. No milho arqueológico do vale do Tehuacan - México, datado de 5310 anos AP, os locos da domesticação *teosinte branched1 (tb1)* e *brittle endosperm2 (bt2)* já haviam perdido a maior parte da variabilidade nucleotídica presente nos teosintos de Balsas, enquanto os locos *teosinte glume architecture1 (tga1)* e *sugary1 (su1)* conservavam níveis parciais de variabilidade nucleotídica ausentes no milho moderno (Vallebueno-Estrada et al., 2016). Outra pesquisa, que analisou estas mesmas amostras arqueológicas de Tehuacan, observou que apesar das semelhanças genéticas ao milho moderno, haviam muitos genes associados às características chave da domesticação do teosinto, contrastando fortemente com os alelos associados às raças de milho moderno (Ramos-Madrigal et al., 2016).

Estes resultados sugeriram um estado de domesticação parcial deste milho arqueológico (Ramos-Madrigal et al., 2016; Vallebueno-Estrada et al., 2016), sendo que nesta época registros comprovaram que o milho já havia chegado na América do Sul há pelo menos ~7150 anos AP no Equador (Stothert, 1985; Pearsall e Piperno, 1990), ~6700 anos AP no Peru (Grobman et al., 2012), ~6500 anos AP nas terras baixas amazônicas da Bolivia (Brugger et al., 2016), ~5300 anos AP em Rondônia, Brasil (Hilbert et al., 2017) e 4190 anos AP no Uruguai (Iriarte et al., 2004). As análises genômicas realizadas por Kistler et al. (2018) corroboraram com estas hipóteses e demonstraram que as populações de milho apresentaram assimetria na ancestralidade com *parviglumis*, o que reforça a teoria de que as populações ancestrais do milho sul

americano se dispersaram do México em estado parcialmente domesticado, tornando-se isolado do pool gênico das populações de teosinto do México (Kistler et al., 2018).

A dispersão durante e após o evento de domesticação é o início do acúmulo da variabilidade, mesmo que, durante este processo, cada evento migratório seja um novo efeito fundador. Se a dispersão é ampla e ocorreu há muito tempo, um conjunto de metapopulações se desenvolve e acumula variabilidade pelo intercâmbio de amostras de populações por parte dos agricultores, pelo fluxo gênico entre variedades e ocorrência de mutações (Louette et al., 1997). A existência dos centros de diversidade do milho foi ocasionada pela hibridação de populações diversificadas, associada às pressões de seleção realizadas pelo ser humano (Perales e Golicher, 2014) e por aquelas impostas pelos ambientes diversos onde o milho foi cultivado. A dispersão do milho ocorreu desde o início do seu processo de domesticação (Piperno e Flannery, 2001; Pohl et al., 2007; Grobman et al., 2012), em duas direções. Uma onda migratória iniciou-se no México, seguiu pelo Oeste e Norte do país, passando pelo Sudoeste e Leste dos Estados Unidos, e continuou até o Leste do Canadá (Matsuoka et al., 2002; Vigouroux et al., 2008). A outra via se deu pelas terras altas do México até o Oeste e Sudoeste das terras baixas, seguiu pela Guatemala, até chegar na América do Sul (Stothert, 1985; Pearsall e Piperno, 1990).

No continente sul americano, a dispersão do milho nas terras baixas ocorreu independente da dispersão ao longo dos Andes (Freitas et al., 2003; Freitas e Bustamante, 2013). Estudos demonstraram que o processo de dispersão da espécie no continente sul americano contribuiu para a divisão dos dois maiores grupos genéticos do milho, o grupo andino e outro das terras baixas da América do Sul (Matsuoka et al., 2002; Freitas et al., 2003; Lia et al., 2007; Vigouroux et al., 2008; van Heerwaarden et al., 2011; Freitas e Bustamante, 2013; Bedoya et al., 2017). Estes estudos sugeriram que as raças de milho das terras baixas da América do Sul apresentam mais relação com as raças da América Central do que com as raças dos Andes (Freitas et al., 2003; Vigouroux et al., 2008; van Heerwaarden et al., 2011; Freitas e Bustamante, 2013; Bedoya et al., 2017). No entanto, Kistler et al. (2018) apontaram que um grupo genético de milho chegou no Sudoeste da Amazônia e a partir desta região se dividiu, dando origem ao grupo andino (que ficou mais isolado) e ao grupo das terras baixas. Sugeriu-se ainda que, posteriormente, uma nova leva de milho chegou na parte norte costeira do continente. As antigas raças de milho do México não estão diretamente associadas às raças consideradas primitivas da América do Sul, o que sugere uma longa separação temporal entre as raças destas regiões (Bedoya et al., 2017). O isolamento entre estes grupos ocorreu, sobretudo, devido a isolamentos culturais referentes às populações humanas do passado.

O milho é uma espécie cultivada e sua dispersão se deu por meio da migração humana ou intercâmbio amistosos ou não entre grupos humanos ao longo do continente. Um estudo foi realizado, a partir de dados linguísticos, com o intuito de estabelecer quando e onde o milho desenvolveu importância para diferentes grupos humanos pré-históricos nas Américas (Brown et al., 2014). A reconstrução linguística mais velha referente ao milho (6591 anos AP) (Brown et al., 2014) está localizada próximo à região do início da domesticação no vale do rio Balsas, México (Matsuoka et al., 2002). De forma geral, as determinações identificadas concordaram com as informações precedentes em relação ao tempo e espaço da domesticação e dispersão da espécie (Brown et al., 2014). Nas terras baixas da América do Sul, a reconstrução linguística mais antiga foi de 4400 anos AP de um grupo Arawak, na região amazônica. Outros registros foram observados de 3000 anos AP, no Mato Grosso, e de 2000 anos AP, no Sul do país. Em

Rondônia, foram estimados em 2000 anos AP, onde foi concentrada a presença de cinco grupos indígenas diferentes, incluindo os Tupi (Brown et al., 2014).

A família linguística indígena Arawak é a maior da América do Sul e apresenta grande expansão nas regiões adjacentes ao Brasil (Walker e Ribeiro, 2011; Aikhenvald, 2013). O milho chegou às terras baixas da América do Sul há pelo menos ~6500 anos AP (Brugger et al., 2016) e os indígenas Arawak foram os primeiros a considerar a cultura importante o suficiente para ter nomes que reconstroem até 4461 anos AP (os termos para milho referente à proto-linguagem Arawak do Sul, Arawak e Arawak do Norte correspondem a *šinki*, *mariki* e *mariki*, respectivamente) (Brown et al. 2014). O grupo Arawak se dispersou a partir da Amazônia Ocidental ao longo das terras baixas, com distribuição geográfica pela periferia da bacia amazônica, tanto pelo Sul quanto pelo Norte (Walker e Ribeiro, 2011; Aikhenvald, 2013). Já o grupo indígena Tupi apresenta a maior população e extensão territorial dentro do Brasil (Aikhenvald, 2013). O modelo linguístico de Schmitz (1991), baseado em Migliazza (1982), e as análises de filogenia e filogeografia linguística realizadas por Walker et al. (2012), apresentam hipóteses sobre a origem e dispersão amazônica do grupo Tupi. A espécie tornou-se importante para os grupos humanos pré-históricos Tupi-Guarani, há pelo menos 1550 anos AP (o termo milho referente à proto-linguagem Tupi-Guarani corresponde a *aβati*) (Brown et al., 2014), e se dispersou para o interior do território brasileiro (Migliazza, 1982; Schmitz, 1991; Walker et al., 2012).

Para discutir hipóteses de domesticação e dispersão do milho, diferentes marcadores moleculares têm sido empregados, tais como os microssatélites (SSR) (Matsuoka et al., 2002; Vigouroux et al., 2008; Mir et al., 2013; Bedoya et al., 2017), o gene *alcohol dehydrogenase 2* (*Adh2*) (Freitas et al., 2003; Freitas e Bustamante, 2013; Bustamante et al., 2014) e os *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) (van Heerwaarden et al., 2011; Hufford et al., 2013; da Fonseca et al., 2015; Kistler et al., 2018). Os marcadores moleculares utilizados em análises genéticas podem fornecer diferentes tipos de informação (Avise, 2000). O conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética é fundamental para entender a história evolutiva de populações cultivadas ao longo do processo de domesticação e dispersão (Clement et al., 2010), bem como para orientar a prospecção de seus recursos genéticos (Walter et al., 2007; Vencovsky et al., 2007).

Os marcadores SNPs se referem às posições de uma única base ao longo de uma sequência de DNA que é variável entre indivíduos (Freeland, 2005). Estes marcadores apresentam dois estados alternativos e são considerados bialélicos. Variantes SNPs ocorrem a cada 200-500 pares de bases em regiões não-codificadoras e a cada 500-1000 pares em regiões codificadoras (Brumfield et al., 2003). Os marcadores SNPs têm sido utilizados para estudos de evolução, domesticação e dispersão de várias culturas, como o pêssego, *Prunus persica* (Cao et al., 2014), o cará (*Dioscorea* ssp.) (Girma et al., 2014), a uva (*Vitis vinifera*) (De Lorinzis et al., 2015), e foram utilizados para reavaliar a ancestralidade genética do milho e estimar os efeitos da introgressão dos seus parentes silvestres em acessos de milho (van Heerwaarden et al., 2011; Hufford et al., 2013, Kistler et al., 2018).

As hipóteses da dispersão do milho consideradas neste estudo estão associadas à expansão Arawak e Tupi: a partir de um ponto originário no Sudoeste da Amazônia surgiram diferentes rotas migratórias que se dispersaram para o interior e sul do continente, em diferentes épocas. Com base nas informações genéticas, geográficas e registros históricos, o presente estudo tem como objetivo propor e discutir hipóteses de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul, fornecendo uma base de

comparação para futuras investigações históricas e outros estudos genéticos de populações locais de milho. O entendimento da história de dispersão do milho é relevante uma vez que pode permitir a identificação de áreas com concentração da variabilidade genética da espécie que poderão orientar futuras prospecções e esforços de conservação dos recursos genéticos do milho, tanto *in situ-on farm* como *ex situ*, e que também poderão ser utilizados para o melhoramento genético da espécie.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Abrangência geográfica e coleta de germoplasma

A pesquisa foi realizada pelo Laboratório de Genética Ecológica de Plantas da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo – ESALQ/USP (Brasil) e Laboratório de Fitotecnia y Recursos Fitogenéticos da Universidad de la Republica (Uruguai), durante o período de março de 2016 a dezembro de 2019. Para este estudo foram utilizados acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (BAG), de Sete Lagoas, MG, cuja seleção se baseou principalmente em variedades nativas de modo a representar os tipos de endosperma das raças de milho de origem indígena das terras baixas da América do Sul (duros, farináceos e pipocas), conforme a disponibilidade, por regiões. Buscou-se selecionar variedades locais com origem indígena, sempre que possível. As variedades de milho dentado não foram incluídas neste estudo devido ao fato dos milhos dentados não possuírem origem na região, sendo oriundas de introduções norte americanas realizadas no século XIX (Paterniani e Goodman, 1977). Foram também realizadas novas coletas de variedades locais de milho conservadas *in situ-on farm* em nove microrregiões do Brasil e Uruguai. As coletas, realizadas no período de maio de 2017 a abril de 2019, contemplaram cinco biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa) e nove estados/departamentos (Brasil: Acre, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Rio Grande do Sul, Rondônia; Uruguai: Canelones, Rocha, Tacuarembó) (Figura 1). A realização das coletas contou com o apoio da Rede de Pesquisa Colaborativa do Grupo Interdisciplinar de Estudos em Agrobiodiversidade (InterABio) (Silva et al., 2018). Durante as coletas, procurou-se coletar a máxima diversidade de variedades nativas de milho presente em cada região.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da ESALQ/USP, em dezembro de 2016; pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), processo CAAE 60382016.2.0000.5395; pelo Sistema Nacional de Autorização e Informação em Biodiversidade (SisBio) (cadastro nº 61447-1), e foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (cadastro nº AD2EF0B). Para as coletas no Uruguai foi obtida autorização junto à *Dirección Nacional de Medio Ambiente* (DINAMA) do *Ministério de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente*.

3.2.2. Caracterização fenotípica das variedades locais de milho

As variedades locais de milho utilizadas neste estudo foram caracterizadas quanto ao tipo de endosperma, com base nos descritores da cultura (Bird e Goodman, 1977) e por meio da consulta aos dados de passaporte dos acessos obtidos no banco de germoplasma da Embrapa (dados disponíveis na plataforma

Alelo: https://www.embrapa.br/en/alelo), com o objetivo de verificar se a estruturação genética das variedades apresenta correlação significativa com os tipos de endosperma por meio do teste exato de Fisher (Fisher, 1935), a 5% de significância, através do *software* PAST versão 4.0 (Hammer et al., 2001). A caracterização do endosperma foi realizada para 145 variedades, já que do total de variedades (184), 39 não possuíam dados disponíveis.

3.2.3. Caracterização molecular das variedades locais de milho

A caracterização molecular foi realizada por meio de 184 acessos de milho, sendo: 126 do Brasil (78 obtidos do banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo; 48 das coletas atuais), 42 do Uruguai (coletas atuais), 14 da Colômbia (concedidos pelo *Grupo de Investigacion en Recursos Fitogeneticos Neotropicales* – GIRFIN –, da Universidad Nacional de Colombia), e dois híbridos comerciais (H1: DKB390PRO e H2:DOW2B587), para fins de comparação. Os acessos foram classificados por grupos regionais (Figura 1) os quais apresentavam relação com as hipóteses de dispersão do milho deste estudo (Tabela 1). Foram definidos os seguintes grupos regionais: Amazônia Sul, Amazônia Norte, Cerrado Centro-Oeste, Colômbia, Caatinga Nordeste, Mata Atlântica Sudeste, Pampa Brasil e Pampa Uruguai.

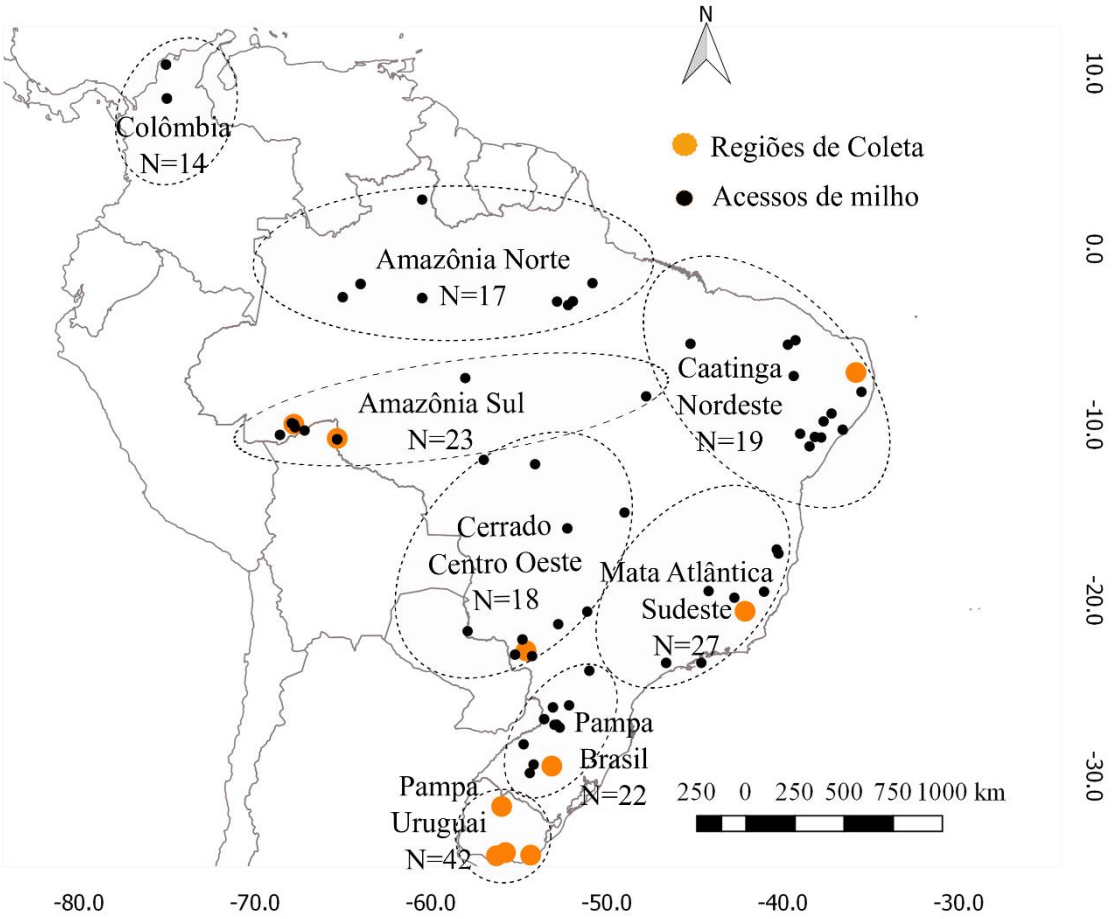

Figura 1. Grupos regionais e distribuição geográfica dos 182 acessos de milho das terras baixas da América do Sul caracterizados por meio da técnica DArTseq. A caracterização molecular também incluiu dois híbridos comerciais.

Tabela 1. Grupos regionais e suas relações com as hipóteses de dispersão Arawak (Walker e Ribeiro, 2011) e Tupi (Walker et al., 2012) nas terras baixas da América do Sul.

Grupo regional	N°	Hipóteses de dispersão
Amazônia Sul	23	Origem das rotas de dispersão Arawak e Tupi
Amazônia Norte	17	1° Rota de dispersão Arawak (mais antiga) / Rotas Tupi
Cerrado Centro-Oeste	18	2° e 3° Rotas de dispersão Arawak / Rotas Tupi
Mata Atlântica Sudeste	27	2° e 3° Rotas de dispersão Arawak / Rotas Tupi
Caatinga Nordeste	19	3° Rota de dispersão Arawak / Rotas de dispersão Tupi
Pampa Brasil	22	2° Rota de dispersão Arawak / Rotas de dispersão Tupi
Pampa Uruguai	42	2° Rota de dispersão Arawak / Rotas de dispersão Tupi
Colômbia	14	-
Híbrido convencional	2	-
Total	184	

3.2.4. Extração de DNA do material vegetal

A extração de DNA das variedades locais foi realizada formando-se dois *bulks* de folhas de 15 indivíduos de cada acesso, os quais representaram 30 indivíduos por variedade (Bedoya et al., 2017), a partir de um fragmento de folha jovem fresca de 1-1,5 cm^2, coletado na terceira semana após o plantio. Após a coleta, as folhas foram liofilizadas e enviadas ao laboratório *Genetic Analysis Service for Agriculture* (SAGA) do *Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo* (CIMMYT), localizado no México, onde a extração de DNA foi realizada. As amostras foram extraídas por meio do método CTAB modificado (Doyle e Doyle, 1990).

3.2.5. Marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) pela técnica DArtSeq

A caracterização molecular das variedades locais de milho, para obtenção de marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), foi realizada pela técnica de genotipagem DArTseq da empresa *Diversity Arrays Technology* - DArT (https://www.diversityarrays.com/technology-and-resources/dartseq/dartseq-data-types/). As amostras foram processadas, avaliadas e analisadas no laboratório SAGA, com base no CIMMYT. A primeira e mais importante etapa desta técnica é a fragmentação do complexo genômico, com o objetivo de desenvolver as bibliotecas genômicas que representem o germoplasma avaliado. No processo de digestão foi utilizada uma combinação de duas enzimas, uma de corte frequente (PstI) e outra de corte raro (NspI); posteriormente foram adicionados *primers* para a etapa de amplificação dos fragmentos criados e adaptadores (*barcodes*) que se ligaram para a identificação das amostras. A biblioteca genômica foi sequenciada no sequenciador *HiSeq 2500* da *Ilumina*. As sequências de cada amostra foram alinhadas com uma biblioteca de sequências representativas

de uma variedade de genomas de milho processados anteriormente. Este processo foi executado pelo *DArTsoft14, software* desenvolvido pelo DArT. Assim, o *pipeline* analítico (*DArTsoft14*) identificou marcadores SNP de forma completamente independente de qualquer genoma de referência. Este método torna os marcadores DArTseq robustos e praticamente livres de qualquer viés de verificação enfrentado por muitas outras tecnologias de genotipagem e geração de SNPs, o que é extremamente importante quando é avaliada a diversidade genética de uma população.

3.2.6. Análise estatística dos dados moleculares

Os marcadores moleculares SNPs foram obtidos e filtrados com base nos seguintes critérios: *Call Rate* ≥ 0.95 (proporção de amostras para as quais as informações correspondentes do marcador não correspondem a dados faltantes); *RepAvg* (proporção de pares de ensaios técnicos replicados para os quais a pontuação do marcador é consistente) ≥ 0,85; *AvgPIC* (média do conteúdo de informação de polimorfismo dos alelos de referência e SNP) > 0. A estruturação genética dos dados moleculares foi avaliada por meio da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC). Para realizar a DAPC, foi utilizado o pacote adegenet (Jombart, 2008) no programa R (R Development Core Team, 2015). A DAPC define um número de agrupamentos e apresenta a estruturação genética de forma que a variação seja minimizada dentro dos grupos e maximizada entre os grupos (Jombart et al., 2010). Foi calculado por meio do método *K-means* e o *Bayesian Information Criterion* (BIC) o número ótimo de grupos, sem considerar a informação quanto ao número de grupos *a priori* e não assumindo que os grupos atendam aos pressupostos do equilíbrio de Hardy-Weinberg ou ausência de ligação entre os locos (Pritchard et al., 2000). A caracterização fenotípica permitiu analisar se os grupos identificados pela DAPC se associaram ao tipo de endosperma das variedades. Para verificar esta associação, foi realizado o teste exato de Fisher (Fisher, 1935), a 5% de significância, por meio do *software* PAST versão 4.0 (Hammer et al., 2001).

A estruturação genética também foi avaliada por meio do *software* ADMIXTURE versão 1.3.0 (Alexander et al., 2009). O número ótimo de grupos (K) foi indicado pelos menores valores de *Cross-validation* (CV) e erro padrão obtidos na análise. Pela Análise de Agrupamento se verificou a relação genética entre os 184 acessos de milho pelo método Neighbor-Joining, a partir das distâncias genéticas de Nei (Nei, 1972), por meio do pacote ape (Paradis e Schliep, 2018) no programa R (R Development Core Team, 2015). O dendrograma foi construído e editado no programa FigTree v. 1.4.3 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Os acessos de milho foram mapeados às famílias linguísticas indígenas (Eriksen, 2011), assumindo que 400 anos após a conquista ainda existe uma associação às respectivas regiões de origem. As cores que caracterizaram os dendrogramas corresponderam aos agrupamentos definidos pela DAPC, pelos grupos regionais e pelas famílias linguísticas indígenas associadas aos acessos. Também foram realizadas análises de agrupamento separadamente para os pares dos seguintes grupos identificados pela DAPC: ‘G1 + G2’ e ‘G3 + G4’. À análise ‘G1 + G2’ foram adicionadas informações quanto aos tipos de endosperma, do mesmo modo em que à análise ‘G3 + G4’ foram adicionadas informações das raças pertencentes aos acessos que tinham este dado disponível. Os dendrogramas foram enraizados considerando as raças de referência mais antiga da literatura (Brieger et al., 1958) e o tipo de endosperma, pelo acesso que apresentou a maior distância na análise.

Os parâmetros de diversidade genética número total de alelos (*A*), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) e coeficiente de endogamia (*f*), foram estimados por meio do pacote hierfstat (Goudet, 2005) e poppr (Kamvar et al., 2014) no programa R (R Development Core Team, 2015). Os parâmetros foram calculados considerando o conjunto total dos dados moleculares e por grupo da DAPC. A estimativa de diferenciação genética foi avaliada pelo cálculo do F_{ST} entre pares dos grupos identificados pelo *softtware* ADMIXTURE.

3.2.7. Distribuição geográfica da diversidade genética para estudo da dispersão do milho

A distribuição geográfica da estruturação genética do milho foi realizada por meio do cálculo das frequências dos grupos estruturados pela DAPC projetadas em gráficos de setores, os quais representaram os grupos regionais. Os gráficos de setores correspondem a diagramas circulares onde os valores de cada categoria representada são proporcionais às respectivas frequências. Foi realizada uma revisão bibliográfica, com foco na região das terras baixas da América do Sul, com o intuito de levantar informações sobre os registros arqueológicos do milho (datação, região de origem e tipo de amostra identificada). As evidências identificadas pelos padrões genéticos regionais foram associadas aos registros arqueológicos e às hipóteses da dispersão humana Arawak e Tupi (Walker e Ribeiro, 2011; Walker et al., 2012), o que permitiu discutir as hipóteses de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul. A distribuição das famílias linguísticas (Eriksen, 2011) foi projetada no mapa com o objetivo de analisar os grupos indígenas associados aos grupos de milho. O mapa foi elaborado por meio do software QGIS (http://qgisbrasil.org).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Estruturação e diversidade genética do milho nas terras baixas da América do Sul

A caracterização molecular resultou em 50.696 marcadores SNPs e a partir das filtragens foram selecionados 5.313 SNPs. O método *K-means* realizado pela DAPC permitiu identificar a formação de quatro grupos genéticos (Figuras 2a e 2b), indicados pelo K ótimo. Observou-se uma clara separação entre os grupos (Figuras 2a e 2b). Os grupos G1 (cor laranja), G2 (cor azul), G3 (cor verde) e G4 (cor vermelha) agruparam 32, 67, 73 e 12 acessos de milho, respectivamente. Os grupos G2 e G3 se separaram, mas apresentaram-se mais próximos geneticamente, enquanto que os dois menores grupos, G1 e G4, apresentaram-se mais distantes e isolados dos demais. Para marcadores moleculares SNPs, o valor da contribuição dos componentes principais para explicar a variação é baixo devido ao elevado número de variáveis consideradas, as quais envolvem milhares de marcadores (Jombart, 2010). Para a análise DAPC foram retidos 150 componentes principais, dentro dos quais 45 explicaram 50,43% da variação total dos dados. Os dois primeiros componentes principais explicaram 13,22% da variação.

A análise da densidade dos acessos (Figura 2b), representada pelo gráfico em duas dimensões, permitiu observar a interseção entre os grupos ao longo da primeira função discriminante. Observou-se

brandas sobreposições entre os grupos, sendo que o grupo G3 apresentou uma maior interação com todos os grupos estabelecidos, o que também o posicionou na área central do gráfico de dispersão dos acessos (Figura 2a). O G4 apresentou duas curvas principais no gráfico (Figura 2b), a primeira com o pico mais alto por apresentar maior densidade de indivíduos e a segunda com baixa densidade. Este grupo foi composto por 75% de acessos do Sudoeste da Amazônia, pertencentes à raça de milho *Entrelaçado*, e 25% de outras regiões (Cerrado Centro-Oeste e Amazônia Norte). Estes picos secundários estão associados a estas variedades de regiões distintas, as quais estão sob processo de adaptação a diferentes contextos ambientais/culturais e consequente diversificação ou podem estar sujeitas a um algum nível de hibridização com variedades que possuem componentes genéticos pertencentes aos outros grupos.

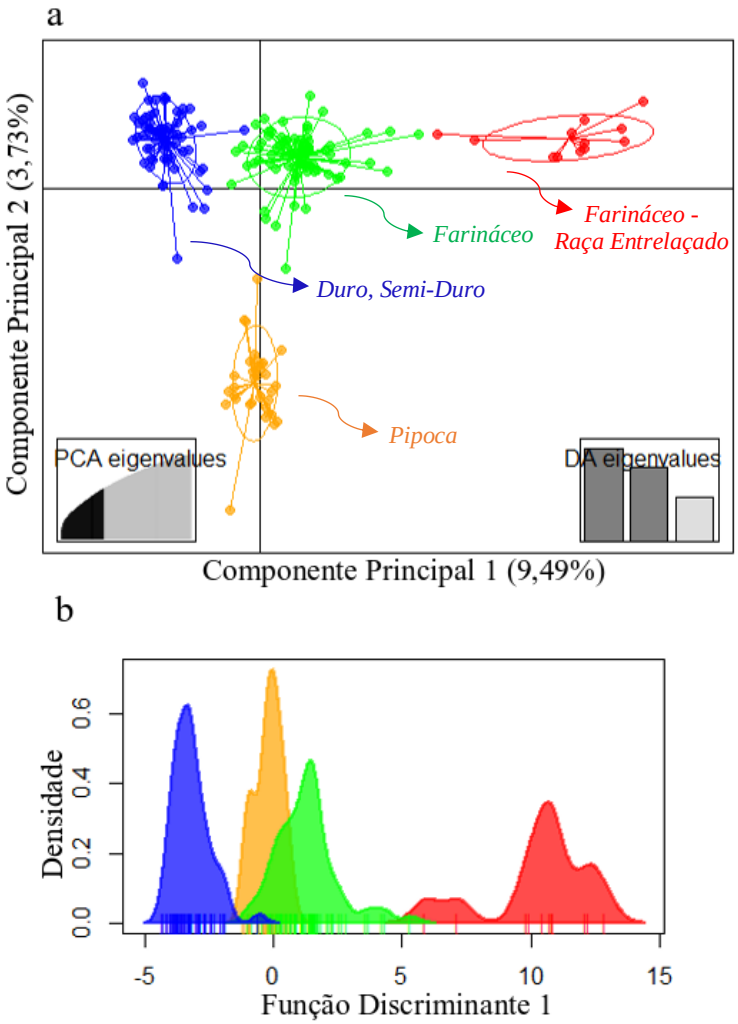

Figura 2. Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) realizada com base em 5.313 marcadores SNPs para 184 acessos de milho. a) Gráfico de dispersão dos agrupamentos formados pelo método de K-means. As setas indicam os tipos de endospermas relacionados aos grupos identificados; b) Gráfico de densidade dos acessos de acordo com os agrupamentos estabelecidos ao longo da primeira função discriminante obtida na DAPC.

A caracterização quanto ao tipo de endosperma permitiu diagnosticar que os grupos identificados pela DAPC se associaram a esta característica (Figura 2, Tabela 2), pelo teste exato de Fisher, que identificou diferença significativa entre todos os pares de grupos da DAPC considerando distintos tipos de endosperma, a 5% de significância. Para discussão neste estudo, destacamos a predominância, ou seja, a ocorrência da maior frequência do tipo de endosperma presente em cada grupo. O Grupo G1 foi caracterizado pelo tipo de endosperma Pipoca (97%); o G2, predominantemente, pelo Duro/Semi-Duro

(68%); o G3, predominantemente, pelo tipo Farináceo (60%); e o G4 pelo Farináceo (100%), sendo 75% pertencente à raça *Entrelaçado*. As cultivares híbridas convencionais encontraram-se no G2. Os grupos G1 e G4 apresentaram-se mais homogêneos com relação ao tipo de endosperma e os demais mais heterogêneos com uma maior predominância de um determinado tipo de endosperma. Estes resultados explicam o isolamento destes grupos em relação aos demais na DAPC.

Tabela 2. Frequência dos tipos de endosperma dentro dos agrupamentos identificados pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) realizada com base em 5.313 marcadores SNPs para 184 variedades locais de milho.

Tipo de Endosperma	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Duro/Semi-Duro	0	0	**34**	**68**	11	21	0	0
Farináceo	1	3	10	20	**31**	**60**	**12**	**100**
Pipoca	**28**	**97**	6	12	10	19	0	0
Total	29	100	50	100	52	100	12	100

A análise de agrupamento apresentou a relação entre os 184 acessos de milho por meio de um dendrograma sem raiz (Figuras 3 e 4a), o qual especifica os relacionamentos entre os acessos e não define o caminho evolutivo dos mesmos. Foram identificados seis grupos: I, II, III, IV, V e VI. Os agrupamentos formados apresentaram grandes conjuntos de acessos relacionados, sobretudo, à estruturação genética identificada pela DAPC (Figura 3), e por conseguinte, pelo de tipo de endosperma. As amostras que apresentaram as maiores distâncias genéticas localizaram-se nos extremos opostos da árvore e corresponderam a um acesso da raça *Entrelaçado*, do Sudoeste da Amazônia, e o outro ao milho pipoca, do Uruguai. A relação dos agrupamentos com os grupos regionais mostrou padrões difusos e de difícil interpretação (Figura 4a), o que indica que nas terras baixas da América do Sul não houveram conjuntos que evoluíram isoladamente.

Os agrupamentos apresentaram padrões que indicam a conexão entre regiões e sugerem um movimento de dispersão direcional, tal como apresentado na Figura 4b. O agrupamento I, se formou com acessos do G3 (predominantemente Farináceo), principalmente da Amazônia Norte, Amazônia Sul e Caatinga Nordeste; o II, com acessos farináceos do G3 e G4 (Farináceo - *Entrelaçado*), da Amazônia Sul, Cerrado Centro-Oeste, Pampa Brasil e Pampa Uruguai; o III, em sua maioria com acessos do G2 (predominantemente Duro/Semi-Duro) do Uruguai; o IV, com acessos do G3, principalmente, da Mata Atlântica Sudeste e da Caatinga Nordeste; o V, com G1 (Pipoca), de diversas regiões, principalmente, da Mata Atlântica Sudeste e Pampa Brasil. O agrupamento VI se caracterizou pelo grupo G2, com acessos, principalmente, da Colômbia, Mata Atlântica Sudeste, Caatinga Nordeste e Pampa Uruguai. Os híbridos convencionais caracterizados encontraram-se no grupo VI.

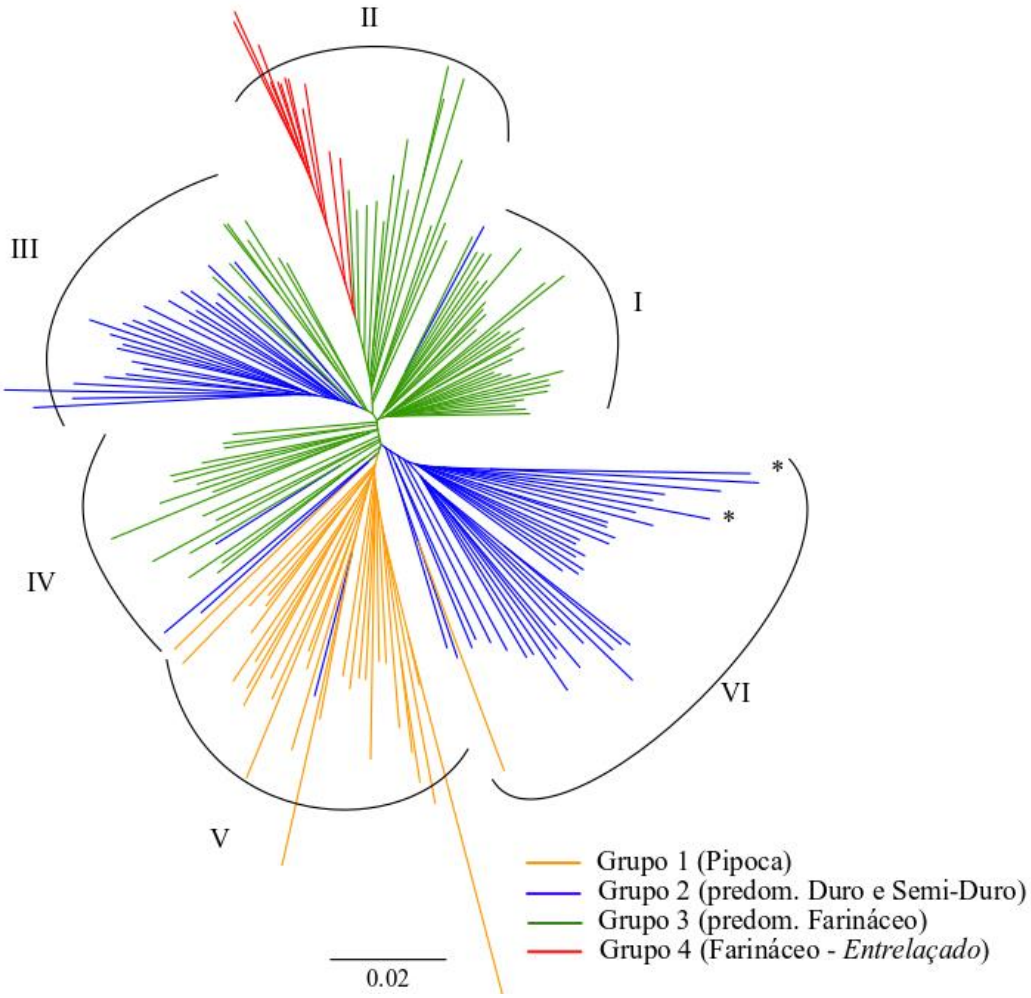

Figura 3. Análise de agrupamento de 184 acessos de milho realizada pelo método *Neighbor-Joining*, com base em 5.313 marcadores SNPs, caracterizada pela estruturação dos grupos identificados pela Análise Discriminante de Componentes Principais. * Acessos referentes aos híbridos convencionais.

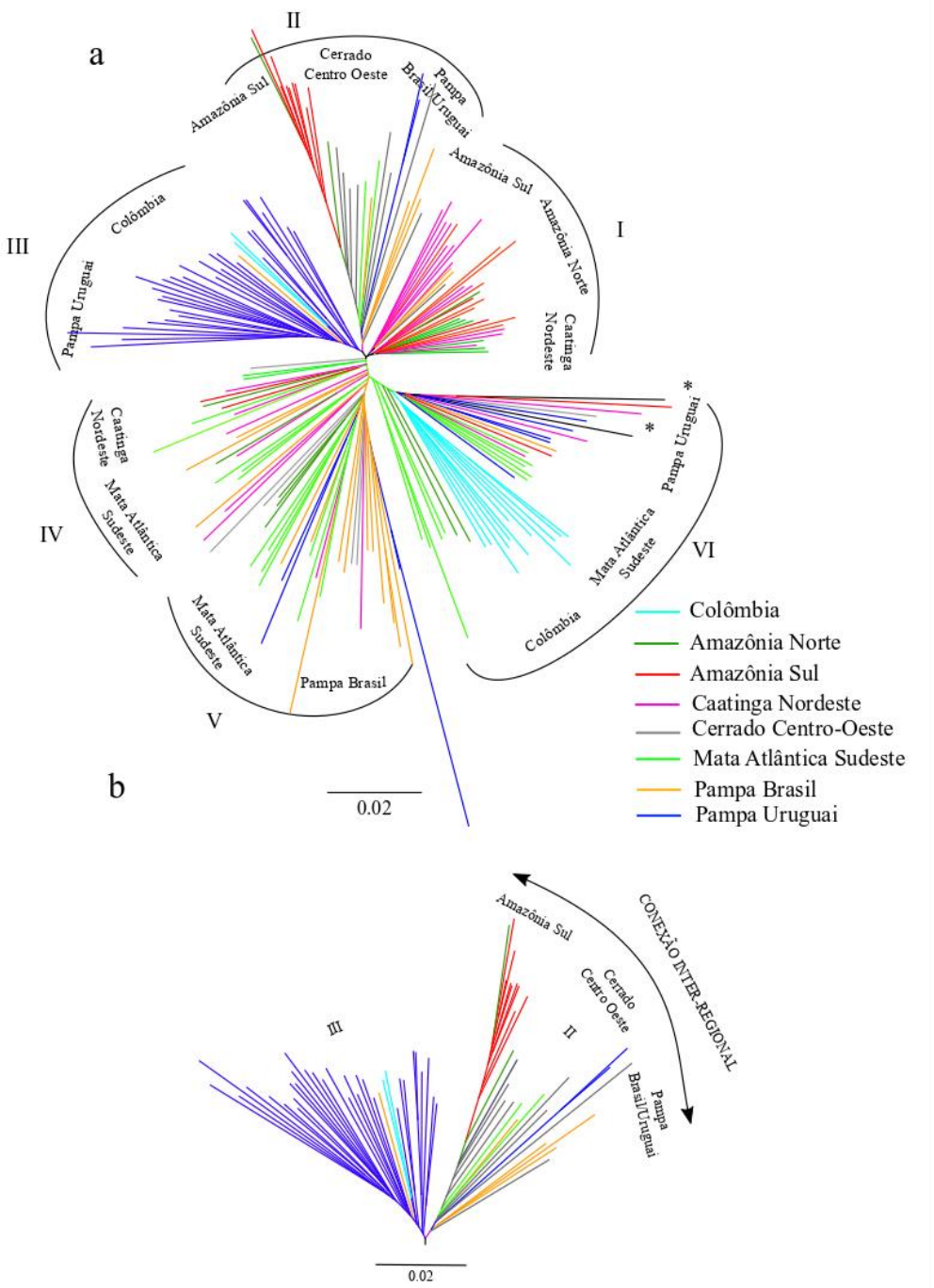

Figura 4. a) Análise de agrupamento de 184 acessos de milho realizada pelo método *Neighbor-Joining*, com base em 5.313 marcadores SNPs, caracterizada pelos grupos regionais das terras baixas da América do Sul; b) Conexão inter-regional identificada no agrupamento II que sugere padrões de movimento direcional e dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul. *Acessos referentes aos híbridos convencionais.

Foram realizadas análises de agrupamento separadamente (Figuras 5a e 5b), considerando os pares dos grupos da DAPC 'G1+G2' (endospermas pipoca e duro) e 'G3+G4' (endosperma farináceo), por apresentarem grau de dureza do endosperma do milho contrastante. As árvores foram enraizadas com o grupo de referência para as raças mais antigas. Na análise 'G1 + G2' (Figura 5a), concentraram-se na base

os acessos de milho pipoca, sendo os primeiros acessos provenientes do Pampa Uruguai e Pampa Brasil, posteriormente observou-se acessos do Cerrado Centro-Oeste, Caatinga Nordeste, Amazônia Norte e Mata Atlântica Sudeste. Em seguida, no G2, embora a predominância tenha sido de acessos de milho duro e semi-duro, provenientes do Pampa Uruguai e da Colômbia, também observou-se algumas misturas por meio da ocorrência do tipo de endosperma Farináceo principalmente destas regiões. Na análise 'G3 + G4' (Figura 5b), encontraram-se na base do dendrograma acessos majoritariamente da raça *Entrelaçado* provenientes da Amazônia Sul (Sudoeste da Amazônia); os acessos do G4 que apresentaram relação mais próxima com os acessos do G3 pertencem às raças *Moroti* e *Entrelaçado*, provenientes do Cerrado Centro-Oeste. Em seguida, encontraram-se os acessos do G3 dentro dos quais estavam presentes as raças farinaceas indígenas *Caingang*, *Moroti* e *Lenha*.

A estrutura genética identificada pelo ADMIXTURE identificou o número ótimo de grupos igual a K = 4, seguido por K = 6 (Figura 6a). Estes valores concordaram com o número de grupos identificados pela DAPC (Figura 6b) e pela análise de agrupamento (Figura 6c), os quais foram apontados no gráfico. Em todos os grupos, foram observadas misturas, sendo o G4 o mais homogêneo, com nível muito baixo de misturas. Este padrão relaciona-se com os resultados apresentado pela DAPC, onde o grupo apresentou-se o mais isolado. O grupo G1 (com predominância de pipoca) apresentou misturas provenientes, principalmente, do G3 e em seguida do G2, com baixo nível de mistura do G4. No grupo G2 (Figura 6b), os primeiros acessos representados no gráfico são acessos de milho farináceo do Uruguai, os quais apresentaram níveis de misturas provenientes do grupo G4, associado à Amazônia Sul. A disposição no gráfico dos acessos do II (Figura 6c) foi ordenada no sentido 'Norte para o Sul', ou seja, os primeiros acessos são provenientes da Amazônia Sul e os últimos do Pampa Uruguai. Observou-se uma diminuição gradual do padrão genético da Amazônia Sul na medida que a espécie se dispersou, passando pelo Cerrado Centro-Oeste, rumo ao Pampa Uruguai. Este resultado corrobora com a hipótese de dispersão sugerida para o II, com base nos padrões de conexão inter-regional apresentados pela análise de agrupamento. Finalmente, o G3 apresentou misturas, principalmente, do G2 e foi o grupo que mais apresentou misturas provenientes do G4.

A divergência genética entre os grupos (K = 4) foi avaliada por meio do cálculo do F_{ST} par-a-par (Tabela 3). A análise apresentou a relação de divergência entre os grupos (K), a qual foi concordante com a estruturação genética dos grupos identificados por meio da DAPC. Com base em Hartl e Clark (1997), a divergência entre os grupos foi considerada: i) moderada (0,05 – 0,15) entre os pares K1xK2 e K2xK3; ii) alta (0,15 – 0,25) entre os pares K1xK3 e K3xK4; e iii) muito alta (> 0,25) entre os pares K1xK4 e K2xK4. Os valores de F_{ST} mais elevados foram identificados para o K4 (relacionado grupo Farináceo - *Entrelaçado*) em relação a todos os outros grupos, o que demonstra ser o grupo mais divergente. A maior divergência foi observada entre K1 (relacionado ao grupo Pipoca) e K4 (Farináceo - *Entrelaçado*) (F_{ST} = 0,3420).

Tabela 3. Estimativas do F_{ST} calculadas, com base em 5.313 marcadores SNPs, entre pares dos grupos identificados pelo *software* ADMIXTURE.

F_{ST}	K1	K2	K3	K4
K1	0			
K2	0,1440	0		
K3	0,1650	0,0860	0	
K4	**0,3420**	**0,2690**	0,2290	0

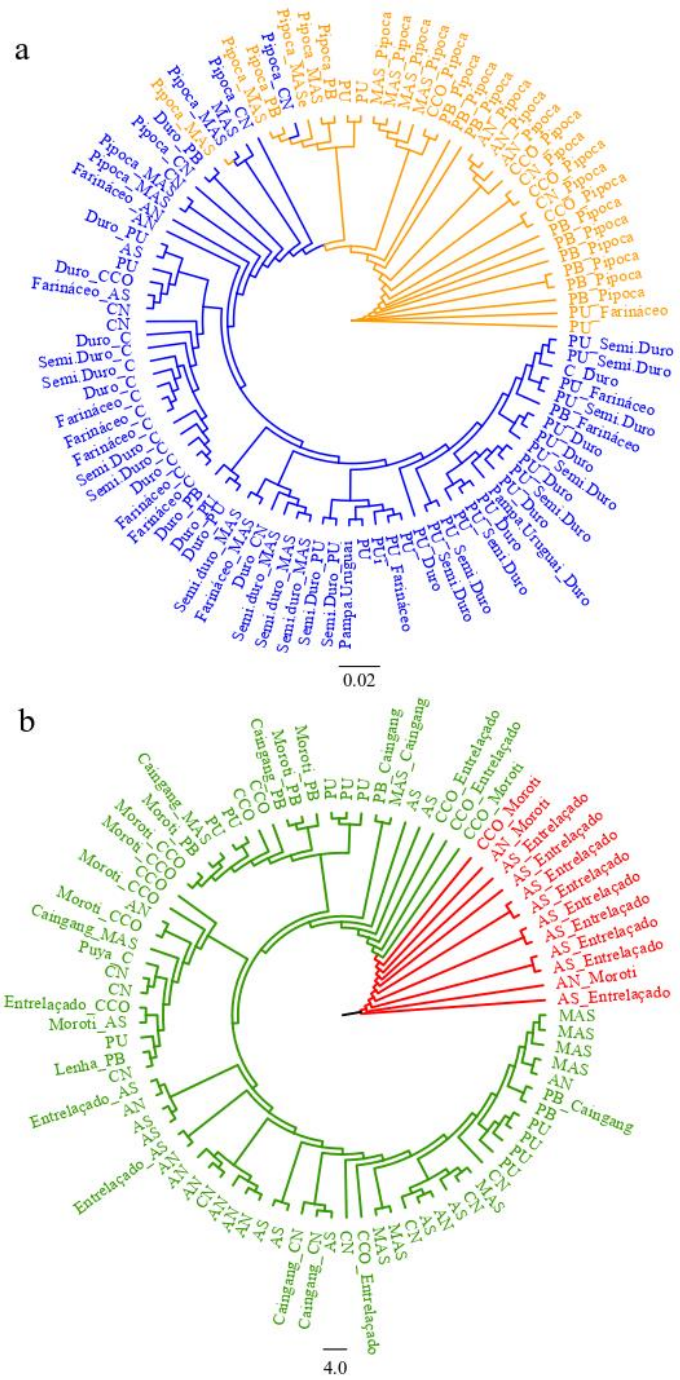

Figura 5. Análise de agrupamento realizada pelo método *Neighbor-Joining*, com base em 5.313 marcadores SNPs, para os acessos de milho dos grupos identificados pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC): a) 97 acessos dos grupos G1 (laranja) e G2 (azul); b) 85 acessos dos grupos G3 (verde) e G4 (vermelho). Os grupos regionais foram representados pelos códigos: Amazônia Norte (AN); Amazônia Sul (AS); Caatinga Nordeste (CN); Cerrado Centro-Oeste (CCO); Colômbia (C); Mata Atlântica Sudeste (MAS); Pampa Brasil (PB); e Pampa Uruguai (PU).

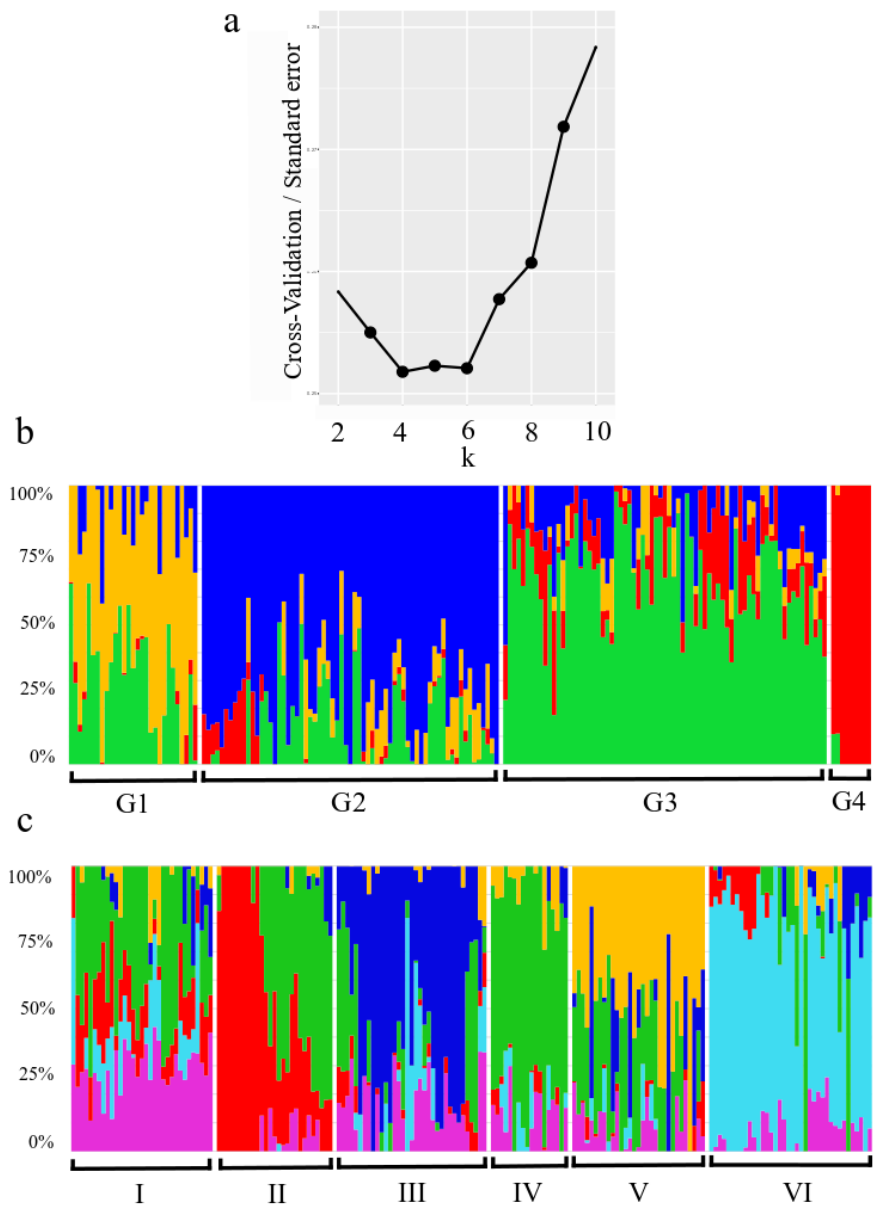

Figura 6. Estrutura genética identificada pelo *software* ADMIXTURE, com base em 5.313 marcadores SNPs, para 184 acessos de milho: a) Cross-validation (CV) e erro padrão do ADMIXTURE, com variação do K de 2 a 10, dentro do qual os menores valores foram K = 4 e K = 6; b) Gráfico de barras representando as probabilidades de ancestralidade de 184 acessos de milho a partir de K = 4; e c) K = 6. Cada barra representa um acesso de milho e as diferentes cores representam as probabilidades dos acessos de pertencerem aos distintos grupos genéticos. As linhas brancas separam os acessos de acordo com os grupos identificados pela DAPC (b) e análise de agrupamento (c).

A AMOVA (Tabela 4) revelou que a maior parte da variação genética ocorre dentro dos grupos avaliados, tanto dos grupos regionais [um total de oito grupos definidos de acordo com a origem dos acessos: Amazônia Sul, Amazônia Norte, Caatinga Nordeste, Cerrado Centro-Oeste, Mata Atlântica Sudeste, Pampa Brasil (todos esses seis grupos do Brasil), além de mais dois grupos, o do Pampa Uruguai e Colômbia], quanto dos grupos da DAPC. A divergência dos acessos entre os grupos regionais foi moderada (Hartl e Clark, 1997), com F_{ST} = 0,08, e apresentou-se significativa. Quando os acessos são comparados considerando os grupos da DAPC, o valor do F_{ST} (0,171) apresentou elevada diferenciação (>0,15) (Hartl e Clark, 1997) e foi também significativo. O valor do F_{ST} para os grupos da DAPC

apresentou-se mais que o dobro do valor identificado para os grupos regionais, o que indica que a diferenciação entre os grupos ocorreu, principalmente, pelos grupos da DAPC, ou seja, pelos tipos de endosperma, do que pelos grupos regionais.

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) baseada em 5.313 marcadores SNPs para os grupos regionais e para os grupos da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC). Valores em negrito indicam as estatísticas correspondentes a diferenciação entre grupos (F_{ST}) em cada AMOVA.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Coeficiente de Variação	Porcentagem da Variação (%)	Estatística F
Entre Grupos Regionais	8	7376,07	29,40	7,97	**F_{ST}=0,08***
Dentro de Grupos Regionais	175	59371,95	339,27	92,03	
Entre Grupos DAPC	3	9138,03	65,79	17,05	**F_{ST}=0,171***
Dentro dos Grupos DAPC	180	57610,00	320,06	82,95	

*Significativo com $p < 0,05$ (*p-value* = 5,00E^{-05}).

As heterozigosidades observadas apresentaram-se maiores que as heterozigosidades esperadas (Tabela 5) nos grupos da DAPC. Este mesmo padrão foi observado nos grupos regionais. Consequentemente, o coeficiente de endogamia (*f*) foi negativo, o que indica haver um excesso de heterozigotos. Para os grupos da DAPC, o maior valor da diversidade genética, com base na heterozigosidade esperada, foi observado no grupo G2 e o menor no G4. Nos grupos G1 e G3, os valores apresentaram-se intermediários. O maior número de alelos foi observado no G3, grupo que apresentou o maior número de acessos, o que pode ter refletido neste resultado. Para os grupos regionais, o maior valor de H_E foi observado no Uruguai e o menor na Amazônia Sul. Os valores do *A* aumentaram gradualmente do Norte para o Sul, sendo que os menores valores foram observados na Colômbia e o maior valor no Pampa Uruguai.

Tabela 5. Parâmetros de diversidade genética para 5.313 marcadores SNPs avaliados em 322 acessos de milho das terras baixas da América do Sul, considerando os grupos identificados pela Análise Discriminante de Componentes Principais (G1, G2, G3, G4 e G5) e grupos regionais (Amazônia Norte, Amazônia Sul, Cerrado Centro-Oeste, Colômbia, Caatinga Nordeste, Mata Atlântica Sudeste, Pampa Brasil e Pampa Uruguai).

Grupo		*N*	*A*	H_O	H_E	*f*
DAPC	G1	32	8834	0.2339	0.1935	-0.2091
	G2	65	9624	0.2797	**0.2077**	-0.3471
	G3	73	9681	0.2764	0.1960	-0.4102
	G4	12	7637	0.1504	0.1200	-0.2530
Regional	Colômbia	14	8379	0.2314	0.1899	-0,2185
	Amazônia Norte	17	8740	0.2870	**0.2030**	-0.4141
	Amazônia Sul	23	8724	0.2235	0.1776	-0.2581
	Caatinga Nordeste	19	8819	0.2805	**0.2043**	-0.3734
	Cerrado Centro-Oeste	18	8559	0.2546	0.1930	-0.3191
	Mata Atlântica Sudeste	27	9079	0.2591	**0.2000**	-0.2960
	Pampa Brasil	22	8792	0.2548	0.1994	-0.2780
	Pampa Uruguai	42	9186	0.2829	**0.2105**	-0.3442

Número de acessos (N), número total de alelos (*A*), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) e coeficiente de endogamia (*f*).

3.3.2. Distribuição geográfica da diversidade genética do milho nas terras baixas da América do Sul

As evidências arqueológicas indicam que o milho chegou às terras baixas da América do Sul há milhares de anos e se dispersou para diferentes regiões (Tabela 6). O registro mais antigo identificado foi datado de 6.500 anos AP no Sudoeste da Amazônia. Estas evidências corroboram com a hipótese de que a região Sudoeste da Amazônia representa a origem das rotas de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul.

A distribuição, por grupo regional, dos padrões genéticos caracterizados pelas frequências dos grupos da DAPC, bem como as hípoteses de dispersão dos grupos de milho sugeridas pela análise de agrupamento, foram associadas aos registros históricos da dispersão humana Arawak (Walker e Ribeiro, 2011) e Tupi (Walker et al., 2012) (representados pelas setas), bem como à distribuição das famílias linguísticas indígenas (Eriksen, 2011), com o objetivo de discutir a dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul (Figura 7). As frequências dos grupos da DAPC foram apresentadas pelo gráfico de setores.

Tabela 6. Datação, região de origem e tipo de amostra referente aos registros arqueológicos de milho das terras baixas da América do Sul.

Datação	Região de origem	Tipo de amostra	Referência
~ 6.500	Lago Rogaguado, Bolivia (Sudoeste da Amazônia)	Pólen	Brugger et al., 2016
~ 6.000	Lago Ayauch, Equador (Oeste da Amazônia)	Pólen e fitólitos	Bush et al., 1989
~ 5.760	Pará, Brasil (Norte da Amazônia)	Pólen e fitólitos	Piperno, 2011
~ 5.300	Lago Ayauch, Equador (Oeste da Amazônia)	Fitólitos	Piperno, 1990
~ 5.300	Alto rio Madeira, Rondônia, Brasil (Sudoeste da Amazônia)	Fitólitos	Hilbert et al., 2017
~ 4.690 ± 40	Peña Roja e Abejas, Colômbia (Oeste da Amazônia)	Pólen	Piperno, 2011
~ 4.645 ± 40	Araracuara, Colômbia (Oeste da Amazônia)	Pólen	Herrera et al., 1992
~ 4.190 ± 40	Los Ajos, Rocha, Uruguai (Sudeste do Uruguai)	Fitólitos e amido	Iriarte et al., 2004
~ 1.390 ± 40	São Francisco do Sul, Santa Catarina, Brasil (Sul do Brasil)	Amido	Wesolowski et al., 2010
~ 990 ± 60	Januária, Norte de Minas Gerais, Brasil (Sudeste do Brasil)	Espiga, grão e palha	Freitas et al., 2003

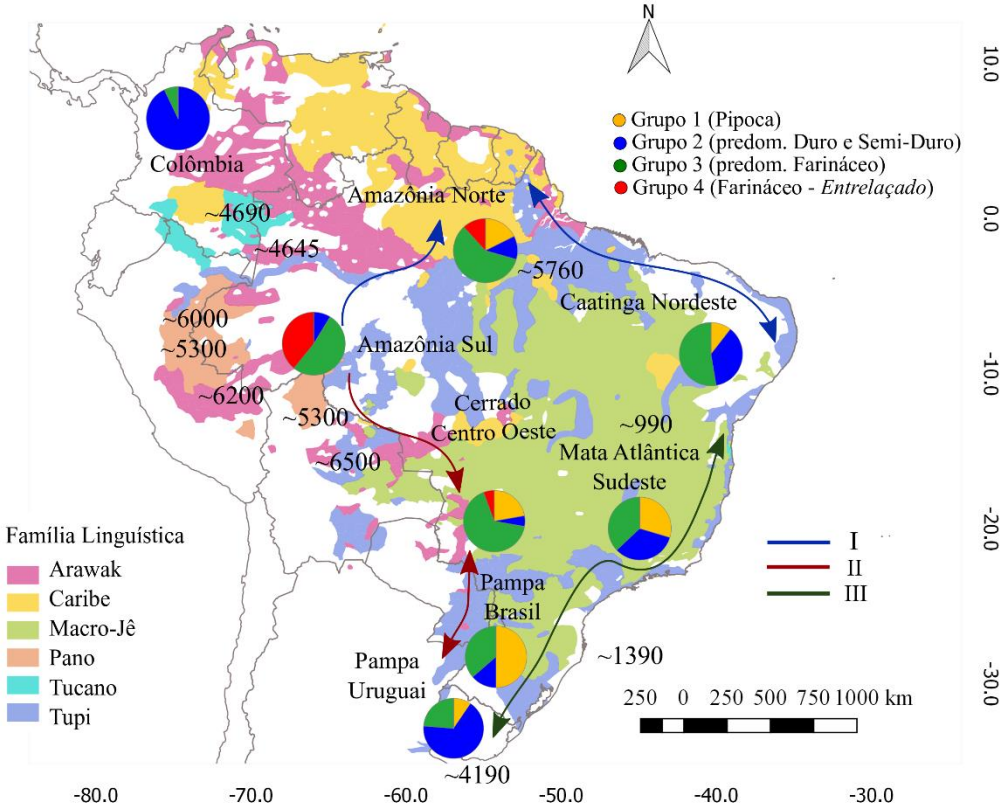

Figura 7. Distribuição geográfica, por grupo regional, da frequência dos grupos da estruturação genética definida pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) e das hipóteses de dispersão do milho sugeridas pela análise de agrupamento realizada pelo método *Neighbor-Joining*, associadas ao histórico das migrações humanas Arawak (Walker e Ribeiro, 2011) e Tupi (Walker et al., 2012) indicado pelas setas, à distribuição das famílias linguísticas indígenas (Eriksen, 2011) e aos registros arqueológicos do milho. Os gráficos de setores representam as frequências dos grupos da DAPC por grupo regional.

O grupo regional Amazônia Sul, o qual envolve a região indicada à origem das rotas migratórias do milho nas terras baixas da América do Sul, sugerida pelo histórico das migrações humanas e registros arqueológicos da espécie, foi caracterizado pela presença dos grupos G2, G3 e G4. A região apresentou a maior frequência do G4, predominantemente composto pela raça *Entrelaçado*, de endosperma farináceo. A ocorrência do G4, em menor frequência, foi observada nas regiões Amazônia Norte e Centro-Oeste, sugerindo que uma pequena porção do grupo se dispersou para estas regiões. Este agrupamento apresentou uma forte relação com a região amazônica. O G3 apresentou uma ampla distribuição geográfica com ocorrência em todas as regiões da pesquisa. Observou-se neste grupo a presença das outras raças indígenas farináceas *Caingang*, *Lenha* e *Moroti* (principalmente de outras regiões fora do Sudoeste da Amazônia). O G1, caracterizado pelo tipo pipoca, encontrou-se em todas as regiões, exceto na Amazônia Sul e Colômbia, com maior frequência no Pampa Brasil. O G2, predominante duro e semi-duro, encontrou-se presente em todas as regiões e foi marcado por apresentar maior frequência ao longo da região costeira, nas regiões do Pampa Uruguai (com elevada frequência), Pampa Brasil Sul, Mata Atlântica Sudeste, e Caatinga Nordeste; e na Colômbia, o grupo apresentou elevada frequência. Este grupo foi observado em menor frequência nas regiões do interior, mais distantes da costa atlântica.

A análise de agrupamento apresentou padrões que indicam a conexão entre regiões e sugerem um movimento de dispersão dos agrupamentos de milho. No agrupamento II, por exemplo, os acessos que apresentaram as maiores distâncias pertencem à raça *Entrelaçado* de milho farináceo, da Amazônia Sul, nj

sendo que os acessos mais relacionados a estes são milhos farináceos do Cerrado Centro-Oeste e, posteriormente, dos Pampas Brasil e Uruguai. A relação entre estes acessos sugere uma conexão entre estas regiões, da Amazônia Sul até o Pampa Uruguai. O agrupamento I sugere um movimento entre a Amazônia Sul, Amazônia Norte até a Caatinga Nordeste; o IV, entre a Mata Atlântica Sudeste e Caatinga Nordeste; e o V, entre a Mata Atlântica Sudeste e Pampa Brasil. Os agrupamentos IV e V apresentaram-se mais relacionados e próximos geneticamente, ambos apresentaram relação com a Mata Atlântica. Estes conjuntos sugerem movimentos de dispersão que envolvem o Pampa Brasil e a Caatinga Nordeste, e se desenvolveram em paralelo na Mata Atlântica Sudeste.

Os acessos de milho foram mapeados às famílias linguísticas indígenas (Eriksen, 2011), assumindo que 400 anos após a conquista ainda existe uma associação às respectivas regiões de origem. Observou-se que 58,2 % dos acessos se associaram com a família linguística Tupi, 22,3 % com a Macro-Jê, 10,3 % com a Arawak e 0,5 % com a Pano. O G3 apresentou a maior riqueza de famílias linguísticas (4) e se associou às famílias Arawak, Macro-Jê, Pano e Tupi. Os grupos G1, G2 e G4 se associaram às famílias Arawak, Macro-Jê e Tupi. Tanto os grupos genéticos estruturados pela DAPC, quanto os grupos identificados pela análise de agrupamento (Figura 8), apresentaram maior predominância do grupo Tupi. Em todos os grupos, observou-se a presença Arawak em menor frequência, exceto no grupo III. Estes resultados sugerem que os eventos de dispersão dos acessos associaram-se, sobretudo, ao grupo Tupi, e a presença escassa de acessos do grupo Arawak nos agrupamentos sugerem vestígios de uma dispersão Arawak mais antiga nestas regiões. Sugere-se que os acessos associados ao grupo Macro-Jê correspondem aos milhos adotados em período mais recente (Brown et al., 2014).

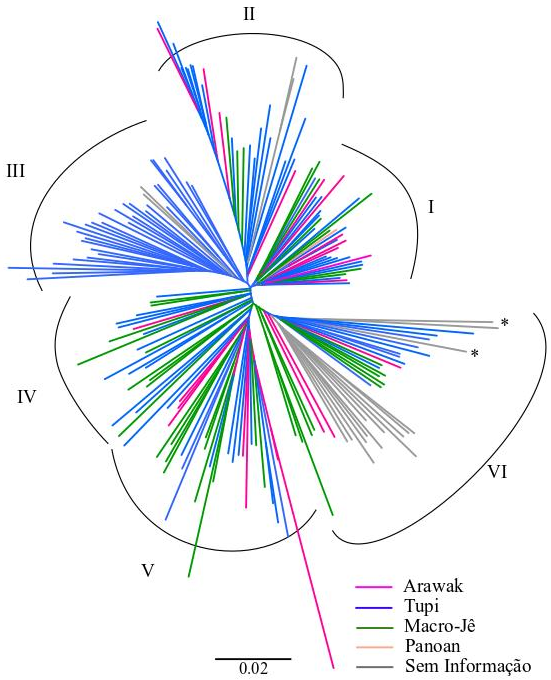

Figura 8. a) Análise de agrupamento de 184 acessos de milho realizada pelo método *Neighbor-Joining*, com base em 5.313 marcadores SNPs, caracterizada pelas famílias linguísticas indígenas (Eriksen, 2011) das terras baixas da América do Sul. *Acessos referentes aos híbridos convencionais.

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul

Os padrões genéticos regionais foram associados aos registros arqueológicos da espécie e às migrações humanas, o que permitiu sugerir as hipóteses de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul. Foram identificados quatro grupos genéticos pela DAPC e seis grupos pela análise de agrupamento, os quais se estruturaram pela predominância de tipos de endosperma específicos. Os grupos identificados pela análise de agrupamento associaram-se aos milhos farináceos (I, II, IV), aos duros e semi-duros (III e VI) e aos pipocas (V). Internamente a cada grupo, observou-se padrões de conexão inter-regional, concordantes com as hipóteses de migração dos grupos indígenas Arawak e Tupi, as quais sugeriram os eventos de dispersão do milho associados a diferentes tipos de endosperma. A análise da estrutura genética sugerida pelo *software* ADMIXTURE sugeriu quatro e seis grupos, sendo concordantes com a DAPC e análise de agrupamento. Foi observado elevado nível de misturas entre os grupos, exceto para o G4. O padrão de misturas entre os grupos é esperado para o milho cujo sistema reprodutivo (espécie alógama) favorece o fluxo gênico entre variedades e pelo fato dos acessos analisados se tratarem de variedades locais, cultivadas tradicionalmente em um sistema de agricultura dinâmico, dentro do qual é frequente o fluxo gênico entre variedades (Louette et al., 1997). O milho das terras baixas da América do Sul recebeu numerosas introduções ao longo do tempo (Kistler et al., 2018), o que sugere que o milho das terras baixas da América do Sul não se desenvolveu a partir de um único conjunto e evoluiu em isolamento.

As hipóteses das rotas de dispersão do milho sugeridas pelo presente estudo, indicadas pelos padrões de conexão interregional dos grupos I, II, IV e V, estão associadas à expansão Arawak (a partir de 5.000 anos AP) e à migração Tupi (a partir de 2.000 anos AP): i) a partir de um ponto originário no Sudoeste Amazônico surgiram diferentes rotas migratórias que se dispersaram para o interior do Brasil, em diferentes épocas; ii) ocorreu uma dispersão, a partir do Sudoeste da Amazônia, direcionada à região Amazônia Norte, que seguiu em direção à Caatinga Nordeste; iii) a partir deste mesmo ponto, um outro evento de dispersão ocorreu em direção ao Sul do Brasil, passando pelo Cerrado Centro-Oeste até alcançar a região Pampa Uruguai; e, iv) movimentos migratórios Tupi, em ambas as direções (do sul para o norte e vice-versa), envolveram as regiões do Pampa Brasil, Mata Atlântica Sudeste e Caatinga Nordeste. A análise realizada por meio do ADMIXTURE sugeriu um padrão de dispersão do grupo II, dentro do qual observou-se uma diminuição gradual do padrão genético característico dos acessos da Amazônia Sul à medida em que a espécie se dispersou para o Sul, passando pelo Cerrado Centro-Oeste, rumo ao Pampa Uruguai. Em todos os agrupamentos, observou-se a predominância do grupo Tupi, o que sugere que os eventos de dispersão dos acessos estão envolvidos, principalmente, com estes povos. Em menor frequência, a presença Arawak também foi observada em todos os grupos, exceto no III (relacionado ao Pampa Uruguai), o que pode indicar vestígios de uma dispersão Arawak mais antiga nestas mesmas áreas, uma vez que as regiões que envolvem as rotas Arawak e Tupi se sobrepõem. No entanto, estas ocorreram em épocas distintas.

Os grupos III e VI da análise de agrupamento apresentaram relação entre as regiões mais extremas e distantes entre si envolvidas na pesquisa, o Pampa Uruguai e a Colômbia. Estes grupos de caracterizaram pela predominância de milhos duros e semi-duros. Brieger et al. (1958) e Paterniani e Goodman (1977) sugeriram um movimento migratório litorâneo na direção Sul-Norte, através dos povos

da família linguística Tupi, e presumiram que a raça de milho *Cateto*, que possui tipo de endosperma duro, é originária da região costeira Brasil-Argentina (bioma Pampa), onde este grupo apresentou o seu máximo desenvolvimento, tendo sido cultivado pelos índios da Costa Atlântica da Argentina até as Guianas (com dispersão na direção Sul-Norte). Na região do Caribe, a distribuição deste grupo é escassa e altamente contaminada por outras raças. Os resultados observados no presente estudo consideram provável que a origem e a dispersão da raça *Cateto*, bem como outras raças do complexo de milho duro, tiveram início nas regiões Pampa Brasil e Pampa Uruguai.

A caracterização morfológica do tipo de endosperma dos acessos permitiu identificar uma associação significativa com os grupos genéticos identificados pela DAPC, confirmado pelo teste exato de Fisher a 5% de significância. Segundo Brieger et al. (1958), os diferentes tipos de endosperma, usos e preferências dos agricultores se relacionam com diferentes etapas do processo de domesticação do milho. Bracco et al. (2016) avaliaram a estruturação genética de variedades de milho das terras baixas da América do Sul por meio da DAPC e também identificaram alguns grupos associados ao tipo de endosperma do milho. As características morfológicas do grão estão associadas ao uso das variedades locais de milho, o que explica as relações genéticas dos grupos associadas aos tipos de endosperma. Estes processos direcionam as frequências alélicas das variedades locais e, certamente, proporcionam consequências genéticas para a formação dos agrupamentos.

Os parâmetros de diversidade foram analisados para os grupos da DAPC e grupos regionais. De forma geral, os valores da diversidade genética com base na heterozigosidade esperada foram considerados elevados e observou-se um excesso de heterozigotos indicado pelo coeficiente de endogamia negativo em todos os grupos. Para os grupos da DAPC, o maior valor da diversidade genética (H_E) foi observado no grupo G2 (0,2077), com predominância de endosperma duro e semi-duro, e o menor no G4 (0,1200), com 100% de endosperma farináceo, e predominância da raça *Entrelaçado*. Para os grupos regionais, os maiores valores de H_E foram observados no Pampa Uruguai (0,2105), Caatinga Nordeste (0,2043), Amazônia Norte (0,2030) e Mata Atlântica Sudeste (0,2000), e os menores na Amazônia Sul (0,1776) e Colômbia (0,1899).

Uma pesquisa avaliou a diversidade genética, por meio de marcadores SNPs, em variedades locais de milho e teosintos coletados diretamente de agricultores no México (Arteaga et al., 2016). Os valores de H_E identificados variaram de 0,234 a 0,318 (média = 0,311) para cada variedade local e corresponderam a 0,226 e 0,234, para *Zea mays* ssp. *mexicana* e *Zea mays* ssp. *parviglumis*, respectivamente. O coeficiente de endogamia negativo também foi observado em 65% das variedades locais de milho caracterizadas, dentro das quais os valores de f variaram de -0,928 a 0,225. Os valores de H_E apresentaram-se mais elevados em relação ao presente estudo, o que é esperado devido ao México corresponder à região onde se originou o processo de domesticação e diversificação do milho (Kistler et al., 2018).

Um aumento gradual em relação ao número de alelos e à diversidade genética do milho do Norte para o Sul foi observado. Este resultado sugere a hipótese de que à medida que a espécie se dispersou do Norte em direção ao Sul, passou a ser mais amplamente cultivada, sob diferentes sistemas de manejo e seleção direcional, e aumentou a diversidade genética ao longo da dispersão. A primeira rota migratória Arawak rumo à direção Norte da Amazônia (Walker e Ribeiro, 2011) ocorreu a partir de 5.000 anos AP (Brown et al., 2014). Os registros arqueológicos indicaram a presença do milho na região há 5.760 anos AP

(Piperno, 2011). Estas evidências sugerem que uma rota de dispersão do milho muito antiga ocorreu neste sentido. Em direção oposta, registros arqueológicos antigos também apontam a presença do milho na região do Pampa Uruguai, há pelo menos 4.190 anos AP (Iriarte et al., 2004), o que também sugere que um movimento migratório antigo ocorreu na direção Sul. Posteriormente, movimentos migratórios indígenas do grupo Tupi também envolveram estas regiões (Walker et al., 2012).

As raças indígenas são, provavelmente, muito similares ao milho cultivado na época pré-colombiana e são consideradas as mais antigas da área de abrangência da pesquisa, e no caso da raça *Entrelaçado*, a sua ocorrência exclusivamente na Amazônia foi notada em estudos anteriores (Brieger, 1958; Paterniani e Goodman, 1977). A presente pesquisa também constatou a presença desta raça, representada pelo G4, principalmente na região amazônica. No entanto, também foi observada a ocorrência de um pequeno fluxo de dispersão para fora da Amazônia, que se originou no Sudoeste da Amazônia e se dispersou para o Cerrado Centro-Oeste. O G3 (predominantemente Farináceo) apresentou uma dispersão ampla e encontrou-se distribuído em todas as regiões da pesquisa. À análise de agrupamento realizada com os acessos dos grupos 'G3 + G4' foram adicionadas informações sobre a raça referente aos acessos. Encontraram-se na base do dendrograma em grande proporção os acessos da raça *Entrelaçado* do Sudoeste da Amazônia. Os acessos do G4 que apresentaram relação mais próxima aos acessos do G3 pertencem à raça *Moroti* e são proveniente de outras regiões (Centro-Oeste e Amazônia Norte). Dentre os acessos do G3 observou-se as raças farinaceas indígenas *Entrelaçado* (sobretudo do Centro-Oeste), *Caingang*, *Moroti* e *Lenha*. Considerando a raça *Entrelaçado*, a mais primitiva e antiga dentre as raças indígenas farináceas das terras baixas da América do Sul (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977), e os resultados desta análise, sugerimos que as outras raças tenham se originado a partir da *Entrelaçado* por meio dos processos de diversificação, hibridização, seleção e dispersão. Estas raças ao se dispersarem para outras regiões se desenvolveram a partir do manejo humano e se adaptaram às distintas condições ecológicas, passando a adquirir características próprias, as quais permitiram distingui-las entre si.

O grupo G2, portador de maior frequência do tipo de grão duro e semi-duro, apresentou maiores frequências no Uruguai e na Colômbia. No Brasil, o grupo apresentou maiores frequências ao longo da Costa Atlântica e menores frequências no interior, o que corrobora com a hipótese de dispersão da raça de milho duro *Cateto* pelo litoral (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977). À análise de agrupamento 'G1 + G2' foram adicionadas aos acessos informações sobre o tipo de endosperma. Nesta análise, concentraram-se na base do dendrograma os acessos de milho pipoca do G1, sobretudo, do Pampa Uruguai e Pampa Brasil. Em seguida, no G2 observou-se uma predominância de acessos de milho duro e semi-duro oriundos, principalmente, do Pampa Uruguai e Colômbia.

O grupo G1, caracterizado por milho pipoca, apresentou-se presente em todas as regiões da pesquisa, exceto nas regiões Amazônia Sul e Colômbia. Um intercâmbio pré-colombiano de pipocas antigas entre o Norte e o Sul da América foi sugerido devido à presença das antigas pipocas sul-americanas *Canguil*, *Confite Puneño* e *Pisankalla* no grupo do México e Sul dos Andes (Bedoya et al., 2017). Embora a presente pesquisa não tenha amostrado nenhum acesso de pipoca no Sudoeste da Amazônia, a pipoca esteve presente próximo à região de origem das rotas migratórias há 6.200 anos AP (Grobman et al., 2012). No Sul, ao milho pipoca foi atribuída grande importância pelos indígenas Guarani, da família linguística

Tupi, que utilizavam as raças pipocas para a alimentação humana em suas aldeias (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977).

O centro de diversidade 'Brasil/Paraguai', proposto por Vavilov, está associado à elevada densidade populacional de índios Guarani no passado (Vavilov, 1992). Esta região, localizada no Sul do Brasil (Extremo Oeste de Santa Catarina), foi indicada como um micro-centro de diversidade do milho, dentro do qual foi diagnosticado um elevado número de variedades locais de milho, sobretudo de milho pipoca, associado a uma expressiva riqueza de características morfológicas do grão, usos, origem, tempo de conservação (Costa et al., 2016). Estas evidências sugerem que o milho pipoca ao chegar na região Sul ganhou importância para os povos que lá habitavam e foi amplamente cultivado e, consequentemente, manejado e diversificado.

Silva et al. (2020, no prelo), realizaram análises da capacidade de expansão de pipocas de toda a América e observaram um gradiente no qual esta característica foi aumentando de tamanho à medida em que se afastava do México (níveis mais baixos) até alcançar o Sul da América do Sul (níveis mais altos). Esta pesquisa sugeriu três hipóteses para discutir estes resultados: i) considerando que o centro de origem e domesticação do milho se iniciou no México, foi sugerido como primeira hipótese que, à medida em que a pipoca se dispersou para outras regiões da América, houve uma seleção visando aumentar a capacidade de expansão; ii) uma segunda hipótese considerou que a pipoca se dispersou da América do Norte para a América do Sul, mas o cruzamento com variedades locais aumentou a diversidade do pool genético e, ao mesmo tempo, permitiu uma seleção mais eficiente da característica de capacidade de expansão; e iii) por último, foi sugerida uma origem sul-americana especificamente para a pipoca, a partir de um pool de genes domesticado ou semi-domesticado existente. Esta hipótese considera uma origem independente da pipoca, e não uma domesticação independente do milho. Este padrão de gradiente quanto ao aumento no tamanho de estruturas ao longo de um eixo geográfico também foi observado por Hilbert et al. (2017), apontando evidências da domesticação do arroz na América do Sul.

A região Amazônia Norte apresentou altos índices de diversidade genética, diagnosticados pelas análises do presente estudo. Esta região recebeu grande influência dos povos indígenas do Caribe (Bedoya et al., 2017). Freitas e Bustamante (2013) também observaram alta diversidade genética do milho no Norte da Amazônia e sugeriram prováveis razões que favoreceram a diversidade nesta zona: i) a região pode ter sido uma via de contato entre diferentes grupos humanos pré-históricos; ii) os rios do Norte serviram como rotas para difusão de populações humanas; iii) a região envolve áreas de baixa e alta altitude propiciando diferentes ambientes para adaptação genética e cultural; e iv) a colonização não-indígena foi mais recente, portanto, um grande percentual da população local ainda é indígena e vive em reservas territoriais e, além disto, as populações não-indígenas que colonizaram esta zona trouxeram consigo novas variedades, ampliando a diversidade que já existia na região.

3.4.2. Potenciais centros de diversificação do milho nas terras baixas da América do Sul

A presente pesquisa ainda sugere a hipótese de dois potenciais centros de diversificação do milho nas regiões: i) Sudoeste da Amazônia (círculo contínuo apresentado na Figura 9); e ii) Pampa Brasil e Pampa Uruguai (círculo pontilhado apresentado na Figura 9). A distribuição geográfica das famílias

linguísticas apresentada no mapa demonstra os principais povos indígenas supostamente envolvidos nos processos de diversificação do milho nestas regiões: i) Sudoeste da Amazônia: Arawak, Pano e Tupi; e ii) Pampa Brasil e Pampa Uruguai: Tupi e Macro-Gê. Observa-se uma distribuição descontínua e em menor frequência do grupo Arawak em direção à região Sul. Esta distribuição supostamente está envolvida a uma onda de dispersão mais antiga deste grupo que ocorreu no sentido Sul. Brown et al. (2014) ainda apresentaram resquícios do alcance Arawak até a região do Chile.

Estes potenciais centros de diversificação foram sugeridos com base em evidências arqueológicas, histórico das raças nativas associado à distribuição geográfica da estruturação genética analisada neste estudo, parâmetros de diversidade e considerando os históricos locais destas regiões enquanto centros de diversificação de espécies cultivadas já relatados por outros estudos (Vavilov, 1992; Hilbert et al., 2017; Kistler et al., 2018; Watling et al., 2018). Estas duas regiões encontram-se geograficamente relacionadas aos centros de diversidade ‘América do Sul: Peru/Equador/Bolívia’ e ‘América do Sul: Brasil/Paraguai’, propostos por Vavilov (Vavilov, 1992). Estudos recentes indicam o Sudoeste da Amazônia como um importante centro de domesticação de diferentes espécies cultivadas, tais como arroz (Hilbert et al., 2017), milho (Hilbert et al., 2017, Kistler et al., 2018), amendoim, mandioca, pimenta (Hilbert et al., 2017, Watling et al., 2018), abóbora e feijão (Watling et al., 2018). O reconhecimento do Sudoeste da Amazônia como um centro de diversificação do milho está mais consolidado em comparação às regiões que envolvem o Pampa Brasil e Pampa Uruguai. No entanto, outros estudos devem ser realizados para aprofundar as análises genéticas com o intuito de consolidar estas regiões, sobretudo as regiões dos Pampas, enquanto um centro de diversificação do milho.

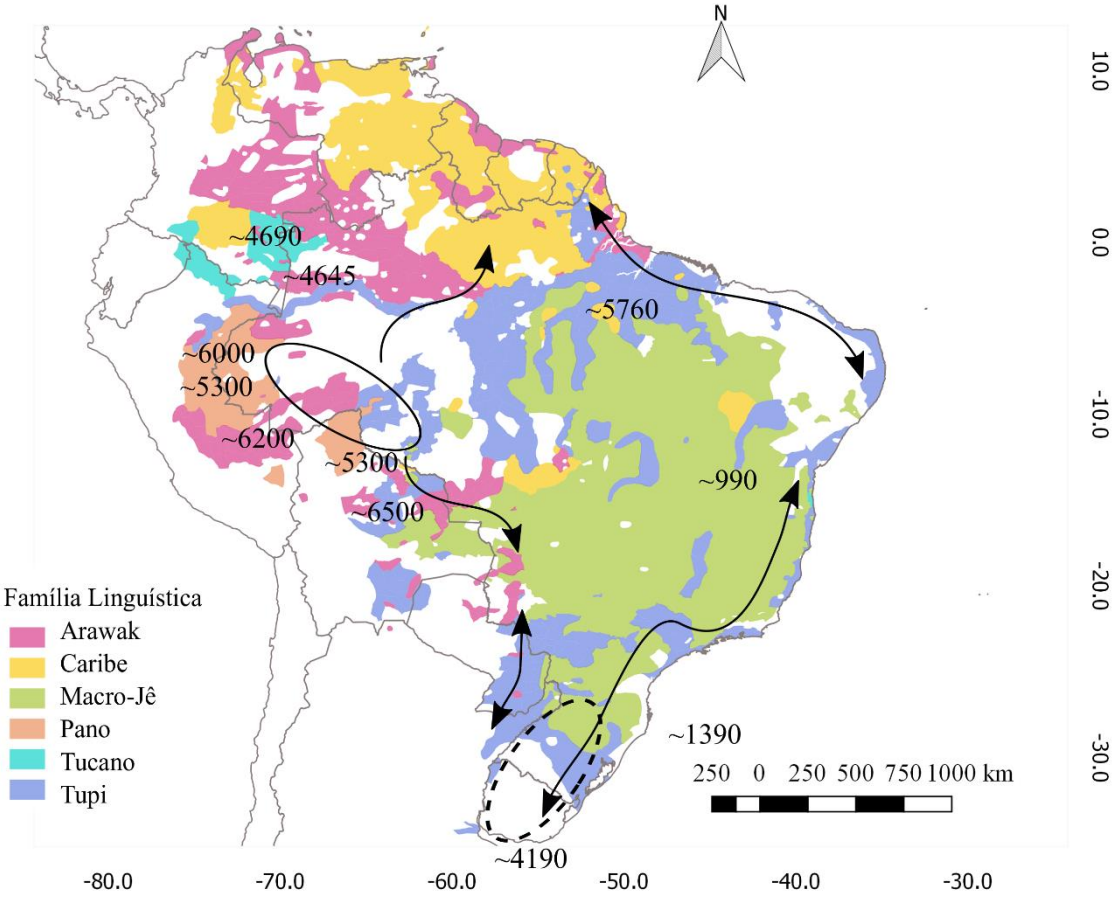

Figura 9. Potenciais centros de diversificação do milho nas terras baixas da América do Sul, associados aos registros arqueológicos de milho, ao histórico das migrações humanas Arawak (Walker e Ribeiro, 2011) e Tupi (Walker et al., 2012) indicado pelas setas e à distribuição das famílias linguísticas indígenas (Eriksen, 2011). O círculo continuo refere-se ao Sudoeste da Amazônia e o círculo pontilhado às regiões Pampa Brasil e Pampa Uruguai.

As evidências arqueológicas apontam a presença mais antiga do milho nas terras baixas da América do Sul nas regiões que envolvem estes potenciais centros (Tabela 6), onde há ~ 6.500 anos AP o milho já havia chegado no Sudoeste da Amazônia e há ~ 4190 anos AP no Uruguai. A distribuição geográfica da estruturação genética dos grupos da DAPC corrobora com o histórico de que nestas regiões se originaram as antigas raças indígenas *Entrelaçado* (G4), no Sudoeste da Amazônia, e *Cateto* (G2), na costa atlântica da região Sul, e depois se dispersaram para outras regiões (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977), uma vez que observou-se maiores frequências das mesmas nestas áreas com uma diminuição gradativa nas direções das migrações humanas Arawak (Walker e Ribeiro, 2011) e Tupi (Walker et al., 2012). Os parâmetros genéticos apresentaram os maiores índices de diversidade na região Pampa Uruguai. No entanto, observou-se o menor valor no Sudoeste da Amazônia, embora a Amazônia Norte tenha apresentado elevado valor de diversidade genética. O baixo valor identificado no Sudoeste da Amazônia pode ter ocorrido em consequência da perda e extinção dos recursos genéticos que ocorreram nesta região (Clement, 1999), os quais podem englobar as raças locais de milho (Brieger et al., 1958; Bedoya et al., 2017), devido ao processo de conquista e colonização européia e à dizimação das populações indígenas (Mann, 2005). Outro fator a ser considerado é que os povos que habitam esta região podem não

ter adotado e introduzido de forma recorrente milhos de outros locais. Além disto, variedades locais introduzidas de outras regiões podem não ter se adaptado ao peculiar ambiente do Sudoeste amazônico.

Bracco et al. (2016) ressaltaram que o milho da região central da América do Sul constitui um pool genético único e localmente adaptado, distinto do germoplasma tropical e andino, e não representa apenas uma região de contato entre raças andinas e raças do leste da América do Sul. Estes autores acreditam que esta região desempenhou um papel importante na estruturação da diversidade genética das raças locais. A realização de estudos dos genes associados aos processos de diversificação do milho pode revelar as funções dos genes envolvidos na evolução da espécie na região. Estes genes são selecionados ao longo e após a domesticação e estão envolvidos com os mecanismos de propagação e adaptação das espécies domesticadas a diferentes condições ambientais e práticas culturais humanas, promovendo a divergência genética das populações (Meyer e Purugganan, 2013).

O estudo realizado por Kistler et al. (2018) sugeriu um centro secundário de melhoramento de milho nas terras baixas da América do Sul. A presente pesquisa ampliou o conhecimento sobre a história evolutiva do milho na região, envolvendo uma amostragem mais ampla, discutiu as hipóteses de dispersão da espécie e ainda sugeriu dois potenciais centros de diversificação do milho nas terras baixas da América do Sul. Com esta maior amostragem realizada, novos estudos deverão ser realizados com o objetivo de aprofundar as análises genéticas destes potenciais centros de diversificação do milho nas terras baixas da América do Sul, por meio da identificação de genes candidatos à seleção exclusivos da região, bem como pela prospecção de genes associados à diversificação e adaptação a novas condições ambientais e culturais. O entendimento da história evolutiva, dispersão e diversificação do milho é relevante uma vez que pode permitir a identificação de áreas com concentração de variabilidade genética que poderão orientar futuras prospecções de germoplasma e esforços de conservação dos recursos genéticos do milho.

REFERÊNCIAS

Aikhenvald, A. Y. (2013). Amazonia: linguistic history. In I. Ness & P. Bellwood (Eds.), *The encyclopedia of global human migration* (pp. 384–391). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Alexander, D. H., Novembre, J., Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19, 1655–1664.

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Arteaga, M. C., Moreno-Letelier, A., Mastretta-Yanes, A., Vázquez-Lobo, A., Breña-Ochoa, A., Moreno-Estrada, A., Eguiarte, L. E., Piñero, D. (2016). Genomic variation in recently collected maize landraces from Mexico. *Genomics Data*. 7, 38–45.

Bedoya, C.A., Dreisigacker, S., Hearne, S., Franco, J., Mir, C., Prasanna, B. M, Taba, S., … Warburton, M. L. (2017). Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PLoS One*, 12(4), e0173488. doi: 10.1371/journal.pone.0173488

Bird, R. M., & Goodman, M. M. (1977). The races of maize V: grouping maize races on the basis of ear morphology. *Economic Botany*. 31, 471–481.

Bracco, M., Cascales, J., Hernández, J. C., Poggio, L., Gottlieb1, A. M., & Lia, V. V. (2016). Dissecting maize diversity in lowland South America: genetic structure and geographic distribution models. *BMC Plant Biology*, 16(186). doi:10.1186/s12870-016-0874-5

Brieger, F. G., Gurgel, J. T. A., Paterniani, E., Blumenchein, A., & Alleoni, M. R. (1958). *Races of maize in Brazil and other eastern South America Countries*. Washington, DC: National Academic of Sciences.

Brown, C. H., Clement, C. R., Epps, P., Luedeling, E., & Wichmann. S. (2014). The Paleobiolinguistics of Maize (*Zea mays* L.). *Ethnobiology*, 5, 52–64.

Brugger, S. O., Gobet, E., van Leeuwen, J. F. N., Ledru, M.P., Colombaroli, D., van der Knaap, W. O., Lombardo, U., … Tinner, W. (2016). Longterm man-environment interactions in the Bolivian Amazon: 8000 years of vegetation dynamics. *Quaternary Science Reviews*, 132, 114–128. doi: 10.1016/j.quascirev.2015.11.001.

Brumfield, R. T., Beerli, B., Nickerson, D. A., & Edwards, S. V. (2003). The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(5), 246–256.

Bush, M.B., Piperno, D.R., & Colinvaux, P.A. (1989). A 6,000 year history of Amazonian maize cultivation. *Nature*, 340, 303–305.

Bustamante, P. G., Pádua, V. L. M., Maia, V. H., & Ferreira, P. C. G. (2014). Evidence of maize (*Zea mays* L.) exploitation around an ancient crossroad linking different aboriginal American civilizations. *Acta Scientiae et Technicae*, 29(1), 2317–8957. doi: 10.17648/uezo-ast-v2i1.56.

Cao, K., Zheng, Z., Wang, L., Liu, X., Zhu, G., Fang, W., ... Wang J. (2014). Comparative population genomics reveals the domestication history of the peach, Prunus persica, and human influences on perennial fruit crops. *Genome Biology*, 14(415). doi:10.1186/s13059-014-0415-1

Clement, C. R. (1999). 1492 and the loss of amazonian crop genetic resources.I. The relation between domestication and human population decline. *Economic Botany*, 53, 188–202.

Clement, C. R., de Cristo, M. A., D'Eeckenbrugge, G. C., Alves, A. P., & Picanço-Rodriges, D. (2010). Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity*, 2, 72–106.

Costa, F. M., Silva, N. C. D. A., & Ogliari, J. B. (2016). Maize diversity in southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(61), 681–700. doi: 10.1007/s10722-016-0391-2.

da Fonseca, R. R., Smith, B. D., Wales, N., Cappellini, E., Skoglund, P., Fumagalli, M., Samaniego, J. A., … Gilbert MT. (2015). The origin and evolution of maize in the Southwestern United States. *Nature Plants*, 1(1403). doi:10.1038/nplants.2014.3

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13–15.

Eriksen, L. (2011). *Nature and culture in prehistoric Amazonia: using GIS to reconstruct ancient ethnogenetic processes from archaeology, linguistics, geography, and ethnohistory* (PhD thesis). Lund University, Lund, Scania, Suécia.

Freeland, J. R. (2005). *Molecular Ecology*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Freitas, F. O., Bandel, G., Allaby, R. G., & Brown, T. A. (2003). DNA from primitive maize landraces and archaeological remains: implications for the domestication of maize and its expansion into South America. *Journal of Archaeological Science*, 30, 901–908.

Freitas, F. O., & Bustamante, P. G. (2013). Amazonian Maize: Diversity, Spatial Distribution and Historical-Cultural Diffusion. *Tipití: Journal of the Society for the Anthropology of Lowland South America*, 11(2), 60–65.

Fisher, R. A. (1935). The logic of inductive inference. *Journal of the Roval Statistical Societv*, 98, 39-54.

Girma, G., Hyma, K. E., Asiedu, R., Mitchell, S. E., Gedil, M., & Spillane, C. (2014). Next-generation sequencing based genotyping, cytometry and phenotyping for understanding diversity and evolution of guinea yams. *Theoretical and Applied Genetics*, 127, 1783–1794.

Goudet, J. (2005). Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 184–186.

Grobman, A., Bonavia, D., Dillehay, T. D., Piperno, D. R., Iriarte, J., & Holst, I. (2012). Preceramic maize from Paredones nd Huaca Prieta, Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 1755–1759.

Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 1-9.

Hartl, D., & Clark, A. (1998). *Principles of Population Genetics*. Oxford University Press.

Hilbert, L., Neves, E. G., Pugliese, F., Whitney, B. S., Shock, M., Veasey, E. A., Zimpel, C. A., Iriarte J. (2017). Evidence for mid-Holocene rice domestication in the Americas. *Nature Ecology & Evolution*, 1, 1693–1698.

Herrera, L. F., Cavelier, I., Rodriguez, C., & Mora, S. (1992). The technical transformation of an agricultural system in the Colombian Amazon. *World Archaeology*, 24(1), 98–113.

Hufford, M. B., Lubinsky, P., Pyhäjärvi, T., Devengenzo, M. T., Ellstand, N. C., & Ross-Ibarra, J. (2013). The genomic signature of crop-wild introgression in maize. *Plos Genetics*, 9, e1003477.

Iriarte, J., Holst, I., Marozzi, O., Listopad, C., Alonso, E., Rinderknecht, A., & Montaña, J. (2004). Evidence for cultivar adoption and emerging complexity during the mid-Holocene in the La Plata Basin, Uruguay. *Nature,* 432, 614–617.

Jombart, T. (2008). Adegenet: A R package for the multivariate analyses of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405.

Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1), 94. doi: 10.1186/1471-2156-11-94.

Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2:e281. doi: 10.7717/peerj.281.

Kistler, L. M., Maezumi, S. Y., de Souza, J. G.; Przelomska, N. A. S.; Costa, F. M. Smith, O., … Allaby, R. G. (2018). Multi-proxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. *Science*, 362(6420), 1309–1313. doi:10.1126/science.aav0207

Lia, V. V., Confalonieri, V. A., Ratto, N., Hernández, J. A., Alzogaray, A. M., Poggio, L., & Brown, T. A. (2007). Microsatellite typing of ancient maize: insights into the history of agriculture in southern South America. *Proceedings. Biological sciences*, 274(1609), 545–554. doi:10.1098/rspb.2006.3747

Louette, D., Charrier, A., & Berthaud, J. (1997). In situ conservation of maize in Mexico: genetic diversity and maize seed management in a traditional community. *Economic Botany*, 51, 20–38.

Mann, C. C. (2005). *1491: New revelations of the Americas before Columbus*. New York, NY: Vintage.

Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sánchez, J. J., Buckler, E., & Doebley, J. F. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 6080–6084.

Meyer, R. S., & Purugganan, M. D. (2013). Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics*, 14(12), 840–852.

Mir, C., Zerjal, T., Combes, V., Dumas, F., Madur, D., Bedoya C, ... Charcosset A. (2013). Out of America: tracing the genetic footprints of the global diffusion of maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 126 (11), 2671–2682.

Migliazza, E. C. (1982). Linguistic prehistory and the refuge model in Amazonia. In G. T. Prance (Ed.) *Biological diversification in the tropics* (pp. 497–519). New York, NY: Columbia University Press.

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283–292.

Paradis, E. & Schliep, K. (2018). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35: 526–528.

Paterniani, E., & Goodman, M. M. (1977). *Races of maize in Brazil and adjacent areas*. Mexico City, Mexico, Mexico: CIMMYT.

Pearsall, D. M., & Piperno, D. R. (1990). Antiquity of maize cultivation in Ecuador: summary and reevaluation of the evidence source. *American Antiquity*, 55(2), 324–337.

Perales, H., & Golicher, D. (2014). Mapping the diversity of maize races in Mexico. PLoS One, 9(12), e114657.

Piperno, D. R. (1990). Aboriginal agriculture and land usage in the Amazon Basin, Ecuador. *Journal of Archaeological Science*, 17(6), 665–677.

Piperno, D. R. (2011). The origins of plant cultivation and domestication in the New World tropics: patterns, orocess, and new developments. *Current Anthropology*, 52, 453–470.

Piperno, D. R., & Flannery, K. V. (2001). The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 2101–2103.

Piperno, D. R., Ranere, A. J., Holst, I., Iriarte, J., & Dickau, R. (2009). Starch Grain and Phytolith Evidence for Early Ninth Millennium B.P. Maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 5019–5024.

Pohl, M. E. D., Piperno, D. R., Pope, K. O., & Jones, J. G. (2007). Microfossil evidence of pre-Columbian maize dispersals in the neotropics from San Andrés, Tabasco, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 6870–6875.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.

R Development Core Team. (2015). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available in: http://www.R-project.org/

Ramos-Madrigal, J., Smith, B. D., Moreno-Mayar, J. V., Gopalakrishnan, S., Ross-Ibarra, J., Gilbert, M. T. P., & Wales, N. (2016). Genome sequence of a 5,310-year-old maize cob provides insights into the early stages of maize domestication. *Current Biology*, 26(23), 3195–3201. doi: 10.1016/j.cub.2016.09.036

Silva, N. C. A., Costa, F. M., Vidal, R., & Veasey, E. A. (2018). Construindo Redes: um breve relato sobre o Grupo Interdisciplinar de Estudos em Agrobiodiversidade. *RG News*, v. 4, p. 48–54.

Silva, N. C. A., Vidal, R., Ogliari, J. B., Costich, D., Chen, J. (2020, no prelo). Relationships among American popcorns and their links with landraces conserved in a micro center of diversity. *Genetic Resources and Crop Evolution.*

Schmitz, P. I. (1991). *Migrantes da Amazônia: a tradição tupi-guarani. Arqueologia do Rio Grande do Sul, Brasil.* São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil: Instituto Anchietano de Pesquisas/UNISINOS.

Stothert, K. E. (1985). The preceramic Las Vegas culture of Coastal Ecuador. *American Antiquity*, 50(3), 613–637.

Vallebueno-Estrada, M., Rodríguez-Arévalo, I., Rougon-Cardoso, A., Martínez González, J., García Cook A., Montiel, R., Vielle-Calzada, J. P. (2016). The earliest maize from San Marcos Tehuacán is a partial domesticate with genomic evidence of inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 14151–14156.

van Heerwaarden, J., Doebley, J., Briggs, W. H., Glaubitz, J. C., & Goodman, M. M. (2011). Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (3), 1088–1092.

Vavilov, N. I. (1992*). Origin and geography of cultivated plants*. Cambridge, England: Cambridge University Press.

Vigouroux, Y., Glaubitz, J., Matsuoka, Y., Goodman, M. M., Sánchez, G. J., & Doebley, J. F. (2008) Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *American Jornal of Botany*, 95, 1240–1253.

Walker, R. S., & Ribeiro, L. A. (2011). Bayesian phylogeography of the Arawak expansion in lowland South America. *Proceedings. Biological sciences*, 278(1718), 2562–2567. doi: 10.1098/rspb.2010.2579.

Walker, R. S., Wichmann, S., Mailund, T., & Atkisson, C. J. (2012). Cultural phylogenetics of the Tupi language family in lowland South America. PLoS One, 7(4), e35025.

Watling, J., Shock, M. P., Mongelo, G. Z., Almeida, F. O., Kater, T., De Oliveira, P. E., ... Neves, E. G. (2018) Direct archaeological evidence for Southwestern Amazonia as an early plant domestication and food production centre. *PLoS ONE*, 13(7), e0199868. doi: 10.1371/journal.pone.0199868.

Wesolowski, V., de Souza, S. M. F. M., Reinhard, K. J., & Ceccantini, G. (2010). Evaluating microfossil content of dental calculus from Brazilian sambaquis. *Journal of Archaeological Science*, 37(6), 1326–1338.

4. MICRO-CENTROS DE DIVERSIDADE GENÉTICA DO MILHO NAS TERRAS BAIXAS DA AMÉRICA DO SUL

RESUMO

Os recursos genéticos vegetais são definidos como uma fração da biodiversidade, que compreende a diversidade de plantas utilizada na agricultura. Os micro-centros de diversidade estão relacionados a áreas geográficas muito restritas, as quais correspondem a zonas de acumulação de recursos genéticos. A região das terras baixas da América do Sul é considerada centro secundário de diversidade genética do milho e um micro-centro de diversidade da espécie foi identificado no Sul do Brasil, em Santa Catarina. A presente pesquisa teve como objetivo ampliar a amostragem e identificar micro-centros de diversidade do milho nesta parte do continente. As regiões envolvidas na pesquisa contemplaram cinco biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa), dentro dos quais foram realizadas coletas de germoplasma e entrevistas com agricultores familiares em cinco regiões no Brasil: Divino, Minas Gerais; Esperança, Paraíba; Ibarama, Rio Grande do Sul; Juti, Mato Grosso do Sul; Guajará-Mirim, Rondônia; e três no Uruguai: La Paloma, Rocha; Tacuarembó, Tacuarembó; Tala, Canelones. Foram obtidos indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares os quais permitiram estimar índices de diversidade genética, como ferramenta metodológica para identificação e caracterização dos microcentros de diversidade do milho. As dificuldades para a conservação da agrobiodiversidade também foram identificadas nas regiões da pesquisa. Os indicadores e os índices de diversidade genética obtidos mostraram que o milho apresenta ampla diversidade, conservada em todas as regiões da pesquisa. Os micro-centros de diversidade de milho foram identificados considerando os seguintes critérios diagnosticados em cada região: i) riqueza e diversidade genética de variedades locais (a maior parte exclusiva) e raças de milho; ii) presença de variedades locais sob diversificação devido a ação humana corrente diagnosticada pelos aspectos socioculturais; e iii) diversidade genética diagnosticada por meio de índices etnobotânicos, fenotípicos e moleculares, os quais indicaram áreas de conservação e acumulação de germoplasma de milho, em escala geográfica microrregional. A partir destes elementos, todas as regiões envolvidas na presente pesquisa foram consideradas micro-centros de diversidade do milho e são indicadas como zonas prioritárias de conservação dos recursos genéticos da espécie nas terras baixas da América do Sul. Por encontrarem-se em zonas vulneráveis à erosão genética, estas regiões também são sugeridas como *hotspots* de agrobiodiversidade.

Palavras-chaves: indicadores de diversidade, variedades locais, recursos genéticos, conservação, *hotspots* de agrobiodiversidade, *Zea mays* spp. *mays.*

Microcentres of maize genetic diversity in the lowlands of South America

ABSTRACT

Plant genetic resources are defined as a fraction of biodiversity, which comprises the diversity of plants used in agriculture. Microcenters of diversity are related to very restricted geographical areas, which correspond to zones of accumulation of genetic resources. The lowlands of South America is considered a secondary center of genetic diversity for maize and a microcenter of diversity of the species has been identified in Southern Brazil, in Santa Catarina. This research aimed to expand the sampling and to identify microcenters of maize diversity in this part of the continent. The regions involved in the research covered five biomes (Amazon, Cerrado, Caatinga, Atlantic Forest and Pampa), within which germplasm collections and interviews with family farmers were conducted in five regions in Brazil: Divino, Minas Gerais; Esperança, Paraíba; Ibarama, Rio Grande do Sul; Juti, Mato Grosso do Sul; Guajará-Mirim, Rondônia; and three regions in Uruguay: La Paloma, Rocha; Tacuarembó, Tacuarembó; Tala, Canelones. Ethnobotanical, phenotypic and molecular indicators were obtained which allowed the estimation of genetic diversity indices, as a methodological tool for the identification and characterization of microcentres of maize diversity. Difficulties for agrobiodiversity conservation were also identified in the research regions. The genetic diversity indicators and indices obtained showed that maize has a wide diversity, conserved in all regions of the research. The microcenters of maize diversity were identified considering the following criteria diagnosed in each region: i) richness and genetic diversity of maize landraces (mostly exclusive) and races; ii) presence of landraces under diversification due to current human action diagnosed by socio-cultural aspects; and iii) genetic diversity diagnosed by ethnobotanical, phenotypic and molecular indices, which indicated conservation areas and accumulation of maize germplasm, on a microregional geographic scale. Based on these elements, all regions involved in the research were considered microcenters of maize diversity and are indicated as priority areas for the conservation of the genetic resources of the species in the lowlands of South America. Because they are located in areas vulnerable to genetic erosion, these regions are also suggested as agrobiodiversity hotspots.

Keywords: diversity indicators, landraces, genetic resources, conservation, agrobiodiversity hotspots, *Zea mays* spp. *mays*.

4.1. INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos são definidos como material genético de valor real ou potencial para o uso da humanidade (CBD, 1992), e compreendem a diversidade genética das espécies cultivadas. A diversidade genética do milho (*Zea mays* spp. *mays* L.) encontra-se distribuída em diferentes sistemas de cultivo pelas Américas (Brieger et al., 1958; Vigouroux et al., 2008; Kato et al., 2009; van Heerwaarden et al., 2011) e pelo mundo (Mir et al., 2013). A região das terras baixas da América do Sul é considerada centro secundário de diversidade genética do milho (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977) e um micro-centro de diversidade da espécie foi identificado no Sul do Brasil, em Santa Catarina, dentro do qual foi identificada uma expressiva riqueza de variedades locais conservadas *in situ-on farm* por agricultores familiares (Costa et al., 2017). No entanto, estudos anteriores apresentam uma grande lacuna amostral de milho nesta parte do continente (Matsuoka et al., 2002; Vigouroux et al., 2008; van Heerwaarden et al., 2011; Bedoya et al., 2017; Kistler et al., 2018). A presente pesquisa foi desenvolvida com o intuito de ampliar a amostragem e o conhecimento sobre os recursos genéticos da espécie conservados nas terras baixas da América do Sul.

Os centros de diversidade se referem aos centros de acumulação de germoplasma e de domesticação *in situ* (Harlan, 1971; Hawkes, 1983), desenvolvidos por populações humanas, as quais obtêm, cultivam e melhoram os seus cultivos, de modo a permitir a manutenção nutricional de suas elevadas densidades populacionais (Clement, 1999). Para caracterizar uma região enquanto centro de diversidade são imprescindíveis os fatores genéticos, biológicos, socioculturais, ecológicos e evolutivos (Serratos, 2009). As regiões consideradas centros de diversidade das espécies cultivadas estão associadas a áreas restritas com elevada diversidade e os micro-centros de diversidade relacionados a áreas geográficas muito restritas, dentro dos quais é acumulada significativa diversidade (Harlan, 1971, 1992). A identificação de micro-centros de diversidade é relevante, pois contribui para: a) entender qual é e como está distribuída a diversidade conservada *in situ-on farm*; b) formular políticas públicas para a conservação de recursos genéticos de importância para a alimentação e agricultura; c) compreender padrões de dispersão de uma espécie; d) orientar estratégias de coleta de germoplasma, considerando zonas de alta diversidade genética; e) desenvolver programas de melhoramento genético. A caracterização da distribuição espacial da diversidade nos micro-centros de diversidade pode ser moldada pela biogeografia das espécies cultivadas, bem como por aspectos humano-geográficos (interação entre a sociedade e o espaço geográfico), que envolvem o grupo étnico, cujos habitantes partilham de uma identidade local e traços culturais, relações sociais, organização e uso do solo e fatores econômicos diversos (Zimmerer e Douches, 1991).

Os centros de diversidade podem envolver distintos níveis de abrangência espacial – macrogeográfica, mesogeográfica e microgeográfica – onde a concentração da diversidade biológica pode ser agrupada. Nesse contexto, uma microrregião pode abranger uma área de 1.000 a 10.000 km² (Zimmerer e Douches, 1991), assim como os centros menores de diversidade correspondem a áreas restritas com moderada a elevada concentração de recursos genéticos de plantas cultivadas, por influência antrópica corrente ou passada (Clement, 1999). Neste caso, a concentração da diversidade está relacionada com um grupo humano portador de cultura específica, com tecnologia agrícola significativa e, por isso, pode ser considerado como um centro de acumulação ao longo do tempo (Clement, 1999). No Altiplano do Peru, por exemplo, as microrregiões, muitas vezes, correspondem a municípios, departamentos políticos que

refletem padrões de organização econômica e sócio-cultural do passado e do presente (Zimmerer e Douches, 1991).

Os centros e os micro-centros de diversidade são moldados pela conservação *in situ-on farm*, a qual corresponde à conservação dos componentes da diversidade biológica em seus ambientes naturais (CBD, 1992). Esta estratégia de conservação envolve a conservação de ecossistemas e hábitats naturais, a manutenção e recuperação de populações viáveis em seus meios naturais e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, nos meios onde tenham desenvolvido suas propriedades características (CBD, 1992). A conservação *in situ-on farm* assume papel essencial na manutenção da diversidade dos recursos genéticos no campo, uma vez que se encontra submetida aos processos evolutivos, promovendo o desenvolvimento adaptativo das espécies quanto às variações climáticas ocorridas ao longo do tempo. A manutenção dos processos ecológicos é fundamental para que as populações persistam em face de um ambiente naturalmente heterogêneo, em continua mudança ante a ação antrópica, e permite a geração contínua de novos recursos genéticos via evolução em seu meio natural e a domesticação em seu meio social (Brush, 2000). No entanto, esses recursos genéticos apresentam-se vulneráveis a perdas dentro do sistema agrícola ao qual estão inseridos, sobretudo, em decorrência da industrialização da agricultura onde os agricultores familiares têm substituído suas variedades locais por cultivares comerciais (Brush, 2000).

As áreas portadoras de grande biodiversidade, ricas em espécies endêmicas, que encontram-se ameaçadas de extinção são chamadas de *hotspots* de biodiversidade (Myers, 1988, 1990, 2000). Essas regiões são consideradas prioritárias para os programas de conservação. O termo *hotspot* foi usado pela primeira vez por Myers (1988) com foco em florestas tropicais. Myers (1990) identificou oito *hotspots* os quais envolveram quatro ecossistemas mediterrâneos e Myers et al. (2000) ampliaram os estudos indicando 25 *hotspots* de biodiversidade. Dentre as áreas indicadas como *hotspots* encontram-se nas terras baixas da América do Sul as planícies da Amazônia Ocidental (Myers, 1988), a região do Cerrado e da Mata Atlântica brasileira (Myers, 2000). A perda da biodiversidade também deve considerar a agrobiodiversidade, ou seja, os agroecossistemas, que envolvem espécies, parentes silvestres, raças e variedades locais que são importantes para a agricultura (Pacicco et al., 2018). Os agroecossistemas fornecem aos seres humanos alimentos, forragens, fibras, combustíveis, móveis, produtos farmacêuticos e serviços culturais (como educação, recreação e turismo, uso tradicional, rituais e costumes vinculados às comunidades humanas) (Pacicco et al., 2018). O desenvolvimento de estratégias de conservação eficientes requer uma compreensão detalhada sobre os padrões espaciais da diversidade genética, os quais podem envolver a identificação de centros de diversidade das espécies cultivadas.

No caso da cultura do milho (*Zea mays* spp. *mays* L.), a distribuição das variedades locais nas paisagens agrícolas pode ser um indicador dos padrões de riqueza e uniformidade da diversidade genética mantida *in situ-on farm* e auxiliar na definição de estratégias de conservação. Um estudo recente sugeriu que o milho chegou nas terras baixas da América do Sul em estado parcial de domesticação e ainda indicou um centro secundário de melhoramento da espécie nesta porção do continente (Kistler et al., 2018). O micro-centro de diversidade de milho identificado em Santa Catarina, no Sul do Brasil, apresentou uma expressiva riqueza de variedades locais, características morfológicas e valores de usos atribuídos às variedades (Costa et al., 2017). Com o intuito de ampliar a amostragem e o conhecimento sobre os recursos genéticos da espécie, e indicar zonas prioritárias de conservação, este estudo teve como objetivo identificar

micro-centros de diversidade do milho nas terras baixas da América do Sul, por meio de indicadores e índices etnobotânicos, morfológicos e moleculares de diversidade genética, em diferentes regiões e biomas do Brasil e do Uruguai.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada durante o período de março de 2016 a dezembro de 2019, pelo Laboratório de Genética Ecológica de Plantas da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo – ESALQ/USP (Brasil) e Laboratório de Fitotecnia y Recursos Fitogenéticos da Universidad de la Republica (Uruguai). Foram realizadas coletas de variedades locais de milho conservadas *in situ-on farm* e caracterizações etnobotânicas, por meio de entrevistas, no período de maio de 2017 a abril de 2019. As coletas e entrevistas contemplaram cinco biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa), cinco estados do Brasil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Rio Grande do Sul e Rondônia) e cinco departamentos do Uruguai (Canelones, Rocha, Treinta y Tres, Tacuarembó e Rivera).

Para a realização das coletas de germoplasma e da caracterização etnobotânica, foram delineadas duas estratégias de trabalho: a primeira, durante a *Oficina Raças de Milho para fins de Conservação* e, a segunda, em visitas *in loco*. Nas Oficinas, os agricultores e agricultoras foram convidados a levar as espigas de cada variedade local que conservavam. Os agricultores foram orientados a realizar a seleção das espigas, quando possível, no momento da colheita, mas sempre escolhendo aquelas que eles consideravam representativas da variedade. A pesquisa realizou um total de sete oficinas nos seguintes municípios: a) La Paloma, Rocha, Uruguai; b) Tacuarembó, Tacuarembó, Uruguai; c) Tala, Canelones, Uruguai; d) Divino, Minas Gerais, Brasil; e) Esperança, Paraíba, Brasil; f) Ibarama, Rio Grande do Sul, Brasil, e g) Juti, Mato Grosso do Sul, Brasil. Em Rondônia, a única estratégia de coleta e entrevistas foi realizada *in loco*, em comunidades ribeirinhas da Reserva Agroextrativista Rio Ouro Preto (RESEX Rio Ouro Preto), em Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil. A realização das coletas contou com o apoio de uma rede de pesquisa colaborativa do projeto, envolvendo universidades, organizações que atuam com a agricultura familiar, instituições de pesquisa e extensão (Figura 1), que foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

As organizações/instituições parceiras foram representadas no mapa (Figura 1): Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), Associação dos Guardiões das Sementes Crioulas de Ibarama-RS, Guardiões Mirins, Prefeitura Municipal, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Universidade Estadual de Maringá (UEM), Banco Comunitário Lucinda Moreti, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Paróquia de Divino, Centro de Tecnologias Alternativas (CTA), Sindicato dos Trabalhadores e Trabalhadoras Rurais na Agricultura Familiar, Rede de Intercâmbios de Tecnologias Alternativas, ASPTA – Agricultura Familiar e Agroecologia, Rede Sementes da Paixão, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Semi-Árido, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO), Reserva Agroextrativista Rio Ouro Preto (RESEX), Universidad de la Republica do Uruguai (Udelar), campus Centro Regional del Este (CURE), Centro Universitário de Tacuarembó (CUT) e Centro Universitário de Rivera (CUR), Red de Semillas Nativas y Criollas, e Sociedad de Fomento de Tala (SFT Tala).

O número de agricultores que participaram em cada região foi determinado de acordo com a indicação dos parceiros locais, logística e o próprio interesse dos agricultores em participar e colaborar com a pesquisa. Deste modo, não houve uma estratégia de amostragem específica para determinar tanto o número de agricultores quanto de variedades locais coletadas por região. Durante as coletas, procurou-se obter a máxima diversidade de variedades locais de milho presente em cada região. Para as variedades que não estavam armazenadas em espiga foi coletada uma quantidade de sementes debulhadas para a caracterização molecular e conservação *ex situ*, e para aquelas variedades em que os agricultores não possuíam estoque de espiga e/ou sementes (ou seja, na ocasião da coleta o agricultor ainda não havia realizado a colheita da lavoura/roça de milho) foi realizada apenas a entrevista, registrando a presença daquela variedade na região. A pesquisa contou com a participação de 261 agricultores e 127 entrevistados (Tabela 1).

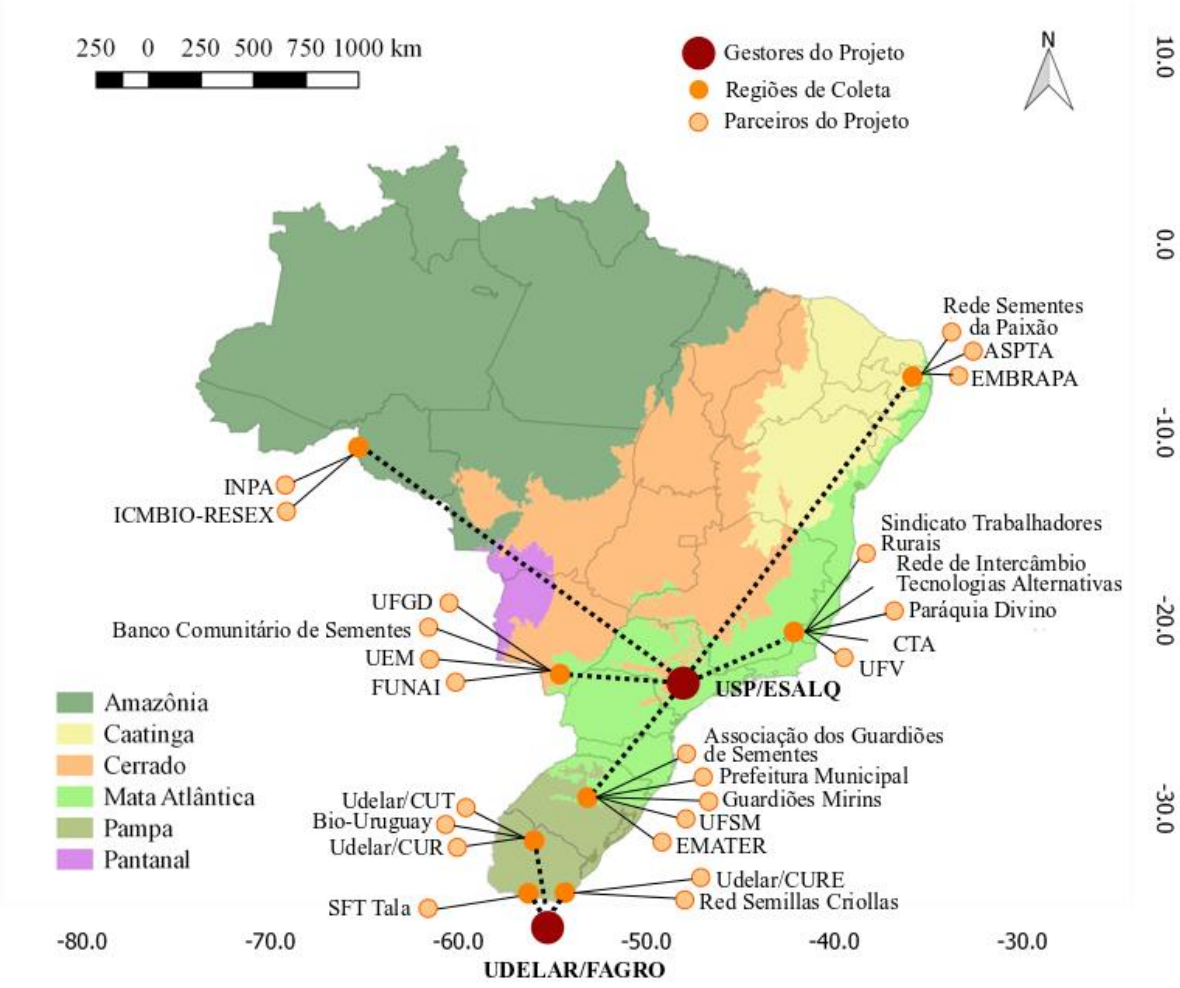

Figura 1. Regiões de coletas e realização das oficinas, instituições gestoras do projeto e rede de organizações parceiras envolvidas na pesquisa. As cores na base do mapa representam a distribuição dos biomas no Brasil e no Uruguai. Esta imagem foi elaborada por meio do software QGIS (http://qgisbrasil.org).

Tabela 1. Número de agricultores participantes da pesquisa (NAPP) e número de agricultores entrevistados (NAE) por região do Brasil e Uruguai.

País	Bioma	Região	NAPP	NAE
Brasil	Cerrado	Mato Grosso do Sul	66	15
	Mata Atlântica	Minas Gerais	55	16
	Caatinga	Paraiba	50	20
	Écotono Mata Atlântica-Pampa	Rio Grande do Sul	40	23
	Amazônia	Rondônia	12	12
Uruguai	Pampa	Canelones	10	10
	Pampa	Rocha/Treinta y Tres	14	14
	Pampa	Tacuarembó/Rivera	14	14
Brasil e Uruguai*	-	Outros	-	3
Total			261	127

* Entrevistas e/ou coletas realizadas em outros encontros fora do âmbito do projeto ou por doações de terceiros.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da ESALQ/USP, em dezembro de 2016; pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), processo CAAE 60382016.2.0000.5395; pelo Sistema Nacional de Autorização e Informação em Biodiversidade (SisBio) (cadastro nº 61447-1), e foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (cadastro nº AD2EF0B). Para as coletas no Uruguai foi obtida autorização junto à *Dirección Nacional de Medio Ambiente* (DINAMA) do *Ministério de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente*.

4.2.1. Caracterização etnobotânica

A caracterização etnobotânica foi realizada por meio de entrevistas sistematizadas onde foi aplicado um questionário semiestruturado, composto por perguntas que envolveram a identificação dos agricultores e o levantamento de informações sobre as variedades locais de milho, como: nome local, origem, tempo de cultivo, usos e registros associados ao cultivo e à história do milho na região. A partir das variáveis relacionadas à origem e ao tempo de cultivo em conjunto, considerando as variedades locais que apresentaram dados completos para estas variáveis (355), foi realizada uma análise descritiva dos fluxos migratórios inter-regionais das variedades locais nas terras baixas da América do Sul, no período de 100 anos. O mapa dos fluxos migratórios inter-regionais foi elaborado por meio do *software* QGIS (http://qgisbrasil.org).

Para cada variável etnobotânica foi realizada uma análise exploratória e inferência dos dados por meio de estatísticas descritivas, conforme o número de observações que apresentaram dados completos. As análises foram realizadas considerando os dados conjuntos do Brasil e do Uruguai, sendo que as particularidades e/ou diferenças marcantes entre cada país e/ou de cada região, quando houveram, foram comentadas ao longo da apresentação dos resultados.

4.2.2. Diagnóstico das fortalezas, oportunidades, fragilidades e ameaças na conservação da agrobiodiversidade

Durantes as Oficinas, foi realizado o diagnóstico das *fortalezas, oportunidades, fragilidades* e *ameaças* (FOFA), com o objetivo de identificar os principais desafios que os agricultores e agricultoras enfrentam na conservação da agrobiodiversidade, sobretudo, em relação às variedades locais. Para isto, foram discutidas com os agricultores as seguintes perguntas: *Quais (i) as forças* (*questões internas à comunidade*), *(ii) oportunidades (externas), (iii) fraquezas (internas) e (iv) ameaças (externas) dos agricultores na conservação da agrobiodiversidade e das variedades locais?* O diagnóstico contou com a participação de 162 pessoas, em três regiões do Brasil (Mato Grosso do Sul: 66 participantes; Minas Gerais: 30; e Rio Grande do Sul: 50) e uma região do Uruguai (Tacuarembó:16). Os participantes foram divididos em subgrupos que variaram de acordo com o número de participantes, município, comunidade e/ou outros critérios tais como grupo de mulheres e grupo de jovens. Cada subgrupo contou com a colaboração de um facilitador. As equipes discutiram a proposta e, posteriormente, apresentaram a síntese da discussão para a plenária. Os tópicos de discussão indicados pelos participantes foram tabulados e uma análise exploratória dos dados foi realizada por meio de estatísticas descritivas.

4.2.3. Caracterização fenotípica

Para cada variedade local foram coletadas cinco espigas ou conforme a disponibilidade que havia na ocasião da coleta. Foram caracterizadas fenotipicamente 287 variedades locais de milho (215 variedades no Brasil e 72 no Uruguai), sendo: 16 no Mato Grosso do Sul, 85 em Minas Gerais, 48 na Paraiba, 59 no Rio Grande do Sul, 4 em Rondônia, 14 em Canelones, 25 em Rocha/Treinta y Tres e 30 em Tacuarembó/Rivera. A caracterização fenotípica foi realizada por meio de 19 descritores morfológicos considerados chaves para a classificação de raças de milho (Bird e Goodman, 1977; Silva et al., 2017), sendo dez características qualitativas e nove características quantitativas, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Descritores morfológicos utilizados para a caracterização de espigas e grãos visando a classificação de raças de milho do Brasil e Uruguai.

	Característica Qualitativa	**Característica Quantitativa**
Espiga	Textura da cor do grão (coroa)	Número de grãos por fileiras
	Cor do grão (coroa)	Comprimento da espiga (cm)
	Tipo do grão (coroa)	Diâmetro da espiga (cm)
	Forma da espiga	Diâmetro do sabugo (cm)
	Arranjo dos grãos na fileira	Diâmetro da ráquis (cm)
	Cor do sabugo	Número de fileiras
Grão	Cor do pericarpo	Comprimento do grão (mm)
	Cor do endosperma	Largura do grão (mm)
	Forma do grão	Espessura do grão (mm)
	Forma da borda do grão	

Para a classificação das raças de milho, as variáveis qualitativas foram obtidas a partir das frequências absolutas de cada variação/categoria dentro da característica e o valor de maior frequência

(moda) foi adotado para caracterizar a variedade para aquela variável. Para as variáveis quantitativas foram obtidas as médias aritméticas. Para classificar as raças de milho, a análise dos dados foi realizada separadamente para cada de tipo de endosperma, em dois níveis. No Nível 1, foi realizada uma análise de agrupamento, pelo método de Ward (hierárquico) com ponto de corte estabelecido pela metodologia de Mojena (1977), considerando todas variedades locais de milho coletadas, por tipo de endosperma, com o objetivo de identificar a estrutura genética populacional. Os dados de cada país foram analisados separadamente, exceto para as pipocas. A distância genética entre variedades foi estimada mediante o índice de similaridade genética de Gower (1971), o qual combina variáveis qualitativas e quantitativas. A partir dos grupos identificados no Nível 1, para cada grupo identificado foi obtida a média das variáveis quantitativas e a moda das variáveis qualitativas. Estes resultados foram utilizados em uma nova análise de agrupamento (Nível 2), em que foram incluídos dados disponíveis na literatura para as raças de milho descritas para o Brasil e do Uruguai, considerando cada tipo de endosperma (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977; De Maria et al., 1978). Esta análise teve como objetivo validar a presença de grupos e classificar as raças atualmente conservadas *in situ-on farm.* As análises multivariadas foram realizadas por meio do software R (R Development Core Team, 2015), pacotes Vegan (Oksanen et al., 2016) e Cluster (Maechler et al., 2015).

4.2.4. Caracterização molecular

A caracterização molecular envolveu 209 acessos de milho provenientes dos estados Mato Grosso do Sul (15), Minas Gerais (46), Paraíba (25), Rio Grande do Sul (26) e Rondônia (8), no Brasil, e dos departamentos de Canelones (17), Rocha/Treinta y Tres (22) e Tacuarembó/Rivera (50), no Uruguai. As amostras do Uruguai incluíram 31 duplicatas e 1 triplicata. A extração de DNA das variedades locais foi realizada formando-se dois *bulks* de folhas de 15 indivíduos de cada acesso, os quais representaram 30 indivíduos por variedade (Bedoya et al., 2017), a partir de um fragmento de folha jovem fresca de 1-1,5 cm^2, coletado na terceira semana após o plantio. Após a coleta, as folhas foram liofilizadas e enviadas ao laboratório *Genetic Analysis Service for Agriculture* (SAGA) do CIMMYT, localizado no México, onde a extração de DNA foi realizada. As amostras foram extraídas por meio do método CTAB modificado (Doyle e Doyle, 1990).

A obtenção de marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) a partir da técnica de genotipagem DarTseq foi realizada pela companhia *Diversity Arrays Technology* – DarT (https://www.diversityarrays.com/technology-and-resources/dartseq/dartseq-data-types/), no *Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo* (CIMMYT). A biblioteca genômica foi sequenciada no sequenciador *HiSeq 2500* da *Ilumina*. As sequências de cada amostra foram alinhadas com uma biblioteca de sequências representativas de uma variedade de genomas de milho processados anteriormente. Este processo foi executado pelo *DarTsoft14*, *software* desenvolvido pelo DarT e os marcadores moleculares SNPs foram obtidos.

Os marcadores foram filtrados com base nos seguintes critérios: *Call Rate* (proporção de amostras para as quais as informações correspondentes do marcador não correspondem a dados faltantes) ≥ 0.95; *RepAvg* (proporção de pares de ensaios técnicos replicados para os quais a pontuação do marcador é consistente) $\geq 0,85$; *AvgPIC* (média do conteúdo de informação de polimorfismo dos alelos de referência

e SNP) > 0. A caracterização molecular resultou em 50.696 marcadores SNPs e a partir das filtragens foram selecionados 5.313 SNPs para realização das análises estatísticas. Os parâmetros de diversidade genética número total de alelos (*A*), heterozigosidade observada (H_O), índice de diversidade genética de Nei (1978) (ou heterozigosidade esperada – H_E) e coeficiente de endogamia (*f*) foram estimados por meio do pacote hierfstat (Goudet, 2005) e poppr (Kamvar et al., 2014) no programa R (R Development Core Team, 2015). Neste estudo, os parâmetros de diversidade foram considerados apenas indicadores de diversidade genética, uma vez que as amostras foram extraídas por meio de *bulks* de indivíduos, os quais formaram uma amostra composta representante de cada acesso.

4.2.5. Índices de diversidade genética como ferramenta metodológica para identificação de microcentros de diversidade do milho

A caracterização etnobotânica, fenotípica e molecular permitiu a obtenção dos seguintes indicadores: i) etnobotânicos: número médio de variedades por agricultores (*NVA*), riqueza de nomes locais (*RNL*), riqueza de nomes exclusivos (*RNE*), riqueza de usos gastronômicos (*RU*), riqueza de origem (*RO*), tempo médio de cultivo (*TM*); ii) fenotípicos: riqueza de cor de grão (*RCG*); riqueza de tipo de grão (*RTG*); riqueza de raças (*RR*); riqueza de raças exclusivas; índice de Shannon dos descritores qualitativos (*H'DQ*); e iii) moleculares: índice de diversidade genética de Nei (1978) (*D*), heterozigosidade observada (H_O) e coeficiente de endogamia (*f*). Os indicadores *RNE* e *RRE* que envolvem o caráter "exclusivo" correspondem aos nomes locais e raças com presença identificada exclusivamente em uma região. O *H'DQ* considerou os descritores: textura da cor do grão, cor do grão, tipo do grão, forma da espiga, arranjo dos grãos na fileira, cor do sabugo, cor do pericarpo, cor do endosperma, forma do grão, forma da borda do grão.

Foram gerados índices de diversidade genética com base nos indicadores obtidos, como ferramenta metodológica para identificação e caracterização dos micro-centros de diversidade do milho (Figura 2). Para cada indicador etnobotânico e fenotípico foram calculados os índices de diversidade de Shannon (*H'*) (Shannon, 1948). Para os indicadores moleculares foram considerados o índice de diversidade genética de Nei (1978) (*D*) e heterozigosidade observada (H_O). A partir do valor médio dos índices etnobotânicos foi gerado um único índice, que foi chamado de "Índice Etno", e pelo mesmo procedimento foram gerados a partir dos índices fenotípicos e moleculares, os "Índice Feno" e "Índice Mol", respectivamente. Estes índices foram obtidos com o objetivo de indicar um valor médio de referência da diversidade genética por região, com base nos seus respectivos indicadores.

O índice de Shannon foi calculado por meio do *software* PAST versão 4.0 (Hammer et al., 2001). O *H'* corresponde a um índice de diversidade utilizado para medir a diversidade em dados categóricos. O cálculo do H' é realizado através da seguinte fórmula:

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} p_i \ln p_i$$, onde:

pi = abundância relativa (proporção) da variedade *i* na amostra

pi = *ni*/*N*

ni = número de indivíduos da variedade *i*

N= número de indivíduos total da amostra

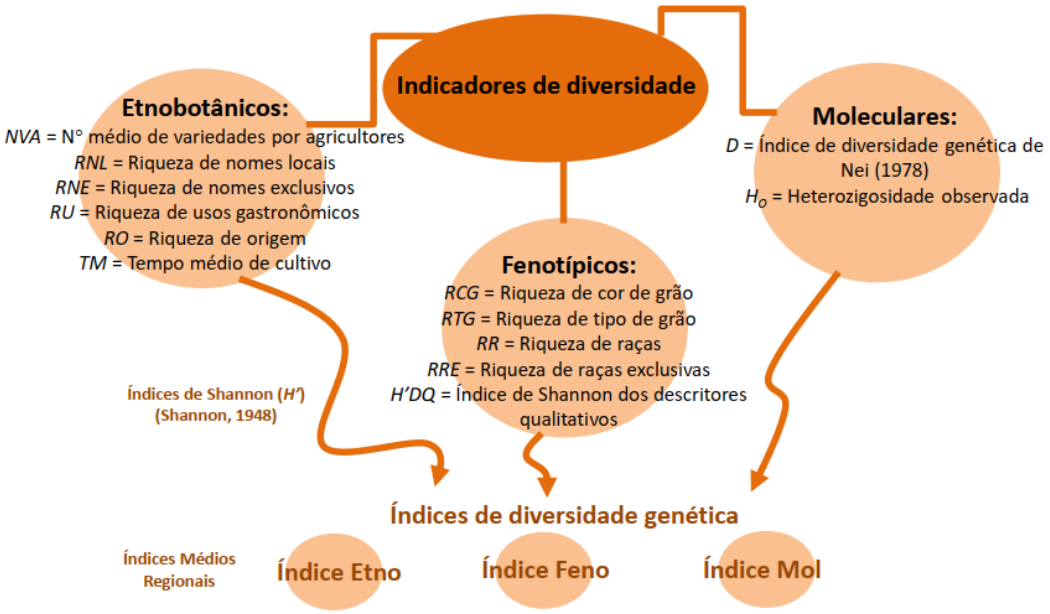

Figura 2. Índices de diversidade genética gerados com base nos indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares, como ferramenta metodológica para identificação e caracterização dos micro-centros de diversidade do milho no Brasil e Uruguai.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Indicadores etnobotânicos do milho em regiões das terras baixas da América do Sul

A diversidade genética das variedades locais de milho foi avaliada por meio de indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares por região (Tabela 3). O número médio de variedades locais conservadas por agricultor variou de um (Canelones) a quatro (Minas Gerais) variedades. Identificou-se uma riqueza de 120 nomes locais atribuídos às variedades no Brasil e 39 no Uruguai (Anexo A e B). No Brasil, a riqueza de nomes locais variou de 17 nomes na Paraiba e também em Rondônia a 47 em Minas Gerais e; no Uruguai, de 8 em Canelones a 25 em Rocha/Treinta y Tres. Dentre os nomes identificados, apenas 23 foram comuns a duas ou mais regiões (Anexo C) e 134 apresentaram-se exclusivos das localidades (Anexo D). Os nomes exclusivos variaram de 4 em Canelones a 33 em Minas Gerais.

Em relação ao destino e uso da produção das variedades de milho, as três categorias mais citadas foram "Autoconsumo da Família" (44%), ou seja, relacionada ao uso direto na alimentação humana nas mais diversas formas; "Alimentação Animal" (33%), na forma de silagem, grão e ração; e "Venda" (16%), de sementes, grãos, palha para artesanato, milho verde, farinha, canjica, dentre outros. As categorias menos frequentes ocorreram de forma localizada: "Doação de Sementes" nos estados da Paraíba, Minas Gerais e Rocha/Treinta y Tres; "Multiplicação de Sementes" apenas nos estados do Mato Grosso do Sul e Tacuarembó/Rivera e; "Artesanato" nos estados do Rio Grande do Sul e Rondônia.

Em geral, foram identificados 34 valores de usos gastronômicos associados às variedades, representados por usos alimentares diretos, potenciais culinários e por atributos do alimento que são apreciados pelos agricultores (Anexo E). Os quatro principais foram Milho Verde (24%), Pamonha/Curau

(11%), “Bolo/Broa/Pão” (10%) e “Farinha” (8%). A região que apresentou a maior riqueza de usos foi Rondônia (20), seguida por Mato Grosso do Sul (18), Minas Gerais (18) e Paraiba (15). Durante as oficinas, em atividades realizadas em grupos, os agricultores citaram os usos relacionados a: i) pratos típicos e ao uso direto na alimentação humana (broa, pão de milho, farinha de beiju, angu, polenta, milho doce, farinha de maisena, pipoca, canjicão, canjiquinha, milho verde, fubá para fazer farinha de amendoim, fubá, cuscuz, munguzá); ii) alimentação animal (sabugo para criação, silagem, ração, grãos para galinhas); iii) uso medicinal (farinha capitão de fubá, sabugo para chá diurético, cabelo do milho para remédio, remédio do milho encapado para dor de estômago e para o fígado) e, iv) outros usos, como cinza do sabugo para fazer sabão, artesanato, simpatia, sabugo como brasa para ferro de passar roupa.

Em relação aos valores de usos agronômicos, representados por características relacionadas ao desempenho agronômico, potencial produtivo, adaptação, resistência/ou tolerância a fatores bióticos e abióticos, foram identificadas 22 categorias, sendo “Rendimento de grão” (32%), “Rusticidade/Adaptação” (14%), “Resistência ao caruncho” (10) e “Resistência à seca” (9%) as mais frequentes. Associados aos atributos gastronômicos e agronômicos, os agricultores indicaram pelo menos 16 motivos pelos quais a conservação das variedades é realizada, sendo que os quatro principais foram: “Animais gostam” (31%), relacionado à palatabilidade; “Conservação da diversidade” (15%), relacionado a aspectos relevantes para a manutenção e riqueza da diversidade da espécie, como conservar mais de duas variedades; “Tradição Familiar” (14%), relacionado a valores culturais provenientes de costumes, tradições e herança de família e; “Autonomia da semente” (11%), seja política, econômica e/ou relacionada à segurança alimentar.

O tempo de cultivo das variedades locais está associado à adaptação das mesmas às condições ecológicas e aos aspectos socioculturais particulares à cada região. Foram identificadas variedades com tempo mínimo, médio e máximo de conservação, de 1, 15 e 100 anos, respectivamente. Os tempos médios das regiões variaram de 8 anos, no Mato Grosso do Sul, a 36, em Rondônia. O tempo máximo de 100 anos foi observado no Mato Grosso do Sul e em Minas gerais. Os resultados também revelaram que: i) 50% das variedades são cultivadas de 0 a 5 anos pela mesma família; ii) 15% de 6 a 10 anos; (iii) 20% de 11 a 30 anos; e iv) 15% cultivam há mais 30 anos. Considerando a origem das variedades, verificou-se que os agricultores obtêm suas sementes, principalmente, por meio de “Herança de Família” (21%), “Vizinhos” (16%), “Encontros de Troca de Sementes” (11%) e “Trocas entre Amigos/Parentes” (11%). Estes resultados demonstram que a principal fonte de obtenção das variedades é a própria região.

Tabela 3. Indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares da diversidade genética do milho em diferentes microrregiões das terras baixas da América do Sul.

Região		Indicadores Etnobotânicos						Indicadores Fenotípicos					Indicadores Moleculares	
		NVA	*RNL*	*RNE*	*RU*	*RO*	*TM*	*RCG*	*RTG*	*H'DQ*	*RR*	*RE*	*D*	H_O
Brasil	Mato Grosso do Sul	3	22	14	18	9	8	6	5	0,89	6	3	0,176	0,181
	Minas Gerais	4	47	33	18	11	17	8	6	1,20	10	4	0,205	0,281
	Paraiba	2	17	13	15	7	15	6	5	1,03	4	1	0,188	0,243
	Rio Grande do Sul	3	39	33	14	11	12	9	5	1,15	14	7	0,202	0,254
	Rondônia	3	17	12	20	8	36	4	2	0,84	1	1	0,123	0,130
Uruguai	Canelones	1	8	4	4	6	17	2	3	0,78	5	0	0,219	0,333
	Rocha/Treinta y Tres	2	25	15	13	6	18	6	4	1,08	8	1	0,196	0,230
	Tacuarembó/Rivera	2	15	8	13	6	16	3	5	0,93	7	2	0,214	0,302

Indicadores etnobotânicos: número médio de variedades por agricultor (*NVA*), riqueza de nomes locais (*RNL*), riqueza de nomes exclusivos (*RNE*), riqueza de usos gastronômicos (*RU*), riqueza de origem (*RO*), tempo médio de cultivo (*TM*); Indicadores fenotípicos: riqueza de cor de grão (*RCG*); riqueza de tipo de grão (*RTG*); riqueza raças (*RR*); riqueza de raças exclusivas (*RE*); índice de Shannon (*H'DQ*); Indicadores moleculares: índice de diversidade genética de Nei (1978) (*D*) e heterozigosidade observada (H_O).

No entanto, observou-se que os agricultores também introduzem e utilizam variedades locais de outras regiões (Figura 3). Foram identificadas 26 (7%) variedades com origem exógena, ou seja, que migraram de outras regiões. No Brasil, foram observados nove eventos de dispersão de variedades entre distintos locais, dentro das quais as regiões doadoras envolveram cinco estados brasileiros e dois países (Bolívia e Peru). No Uruguai, os eventos de dispersão envolveram três países (Argentina, Brasil e Peru). Estes fluxos migratórios diagnosticados ocorreram em diferentes épocas: i) 46% de 0 a 5 anos; ii) 23% de 6 a 10 anos; iii) 27% de 11 a 30 anos; e iv) 4% há mais de 30 anos. A migração mais antiga ocorreu há 50 anos do estado de Santa Catarina para o Rio Grande do Sul, por herança de família (valor cultural). Os processos de dispersão se deram nas seguintes regiões da pesquisa as quais receberam variedades de diferentes locais: Rio Grande do Sul – recebeu variedades de Santa Catarina, São Paulo, Sergipe e Peru; Minas Gerais – do Paraná e Rio de Janeiro; Mato Grosso do Sul – do Paraná e Santa Catarina; Rondônia – da Bolívia; Tacuarembó/Rivera – do Brasil e Peru e; Canelones – da Argentina. As regiões com maior frequência de doação foram Santa Catarina (7 variedades), Bolívia (5 variedades) e Paraná (5 variedades).

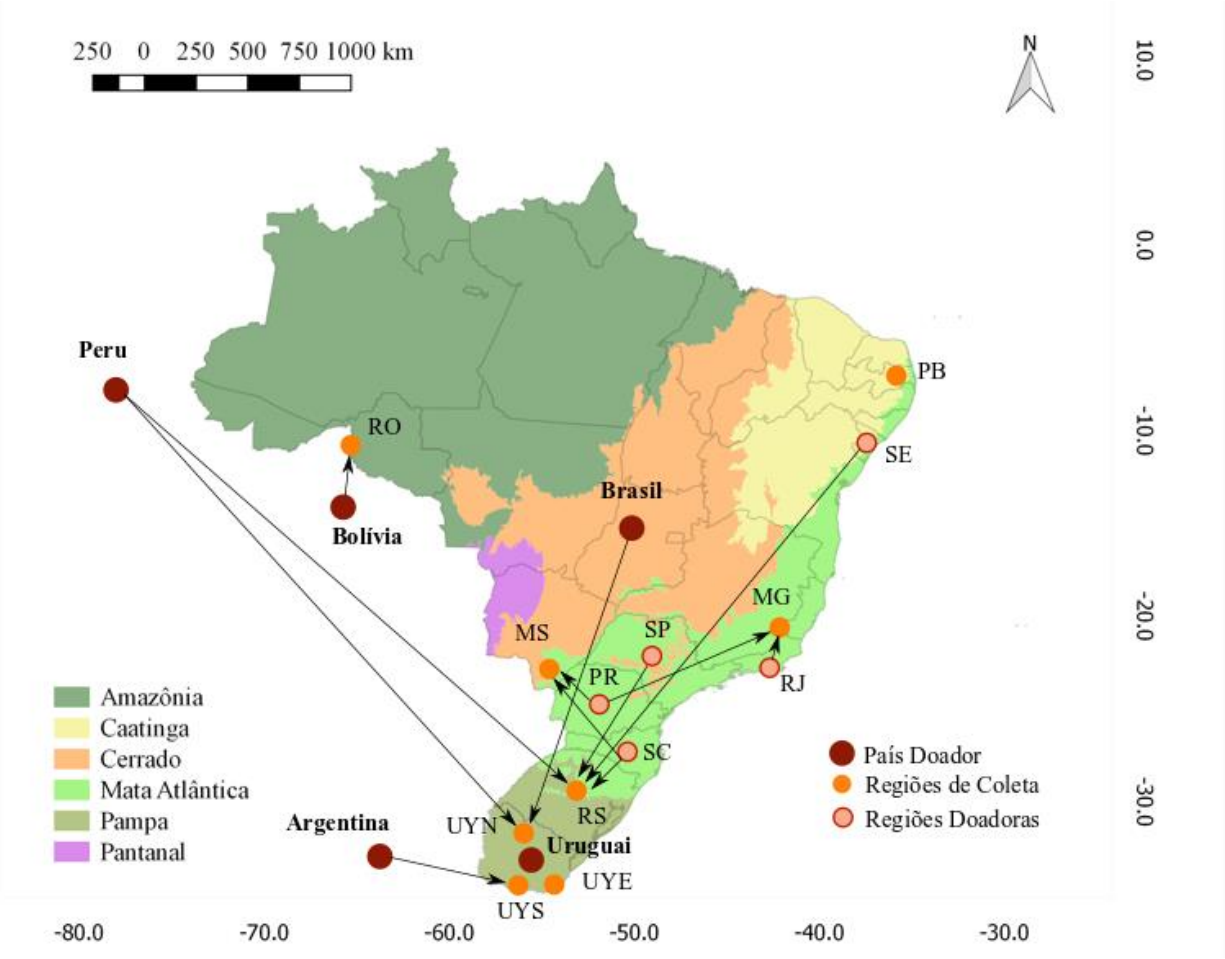

Figura 3. Fluxos migratórios inter-regionais de variedades locais de milho nas terras baixas da América do Sul, ao longo dos últimos 100 anos, caracterizado por meio do diagnóstico etnobotânico. No mapa, as setas indicam a direção dos fluxos migratórios e as regiões foram representadas pelos seguintes códigos: Brasil [Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Paraíba (PB), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS), Rio de Janeiro (RJ), Rondônia (RO), Santa Catarina (SC), São Paulo (SP), Sergipe (SE)] e Uruguai [Rocha/Treinta y Tres (UYE), Tacuarembó/Rivera (UYN) e Canelones (UYS)]. As cores na base do mapa representam a distribuição dos biomas no Brasil e no Uruguai. Esta imagem foi elaborada por meio do *software* QGIS (http://qgisbrasil.org).

Em relação aos sistemas agrícolas, 78% das variedades são manejadas na "Roça/Lavoura", 18% no "Quintal" e 3% na "Mata", sendo que esta última categoria foi observada apenas nos estados de

Rondônia (100%) e do Mato Grosso do Sul (3%). Este aspecto coincide com a presença de comunidades indígenas e ribeirinhas nesses estados, uma vez que nas outras regiões esses atores não foram entrevistados. Nos estados do Rio Grande do Sul e da Paraíba, 100% das variedades são manejadas na "Roça/Lavoura", em cultivo solteiro ou consorciado com uma ou mais espécies, tais como feijão, fava, abóbora, mandioca e café. Em proporção, o manejo das variedades em quintais foi maior no Uruguai (43%) do que no Brasil (8%). Foram identificados pelo menos 29 critérios que os agricultores utilizam para selecionar suas sementes para cultivo, sendo que os três com maior percentual de indicações foram: "Tamanho da espiga" (19%), "Uniformidade dos grãos" (17%) e "Espiga sadia" (12%). No entanto, o resultado mais interessante é que do total, 22 critérios (76%) foram relacionados às características da espiga e do grão, contemplando os descritores científicos chaves (Bird e Goodman, 1977) utilizados para a identificação das raças de milho.

4.3.2. Indicadores fenotípicos do milho em regiões das terras baixas da América do Sul

A caracterização fenotípica apresentou uma expressiva riqueza para os descritores avaliados nas variedades locais de milho. Considerando todas as regiões, foi identificada a riqueza para cor do grão, observando-se um total de 11 cores: Amarelo (32%), Alaranjado (27%), Branco (17%), Vermelho (6%), Amarelo Claro (5,6%), Roxo (5,3%), Castanho (3%), Preto (1,4%), Rosado (1%), Vinho (1%) e Creme (0,7%); e para tipo de grão, um total de 8 tipos: Dentado (51%), Semi-Dentado (16%), Duro (11%), Semi-Duro (11%), Farináceo (7%), Pìpoca (7%), Tunicado (0,7%) e Doce (0,3%). O tipo tunicado identificado pela pesquisa apresenta grãos empalhados individualmente e firmemente aderidos ao sabugo. Dentre as regiões, a riqueza de cor de grão variou de duas a nove cores, e de tipo de grão de dois a seis. As regiões que apresentaram os maiores valores para cor de grão foram Rio Grande do Sul (9), Minas Gerais (8), Paraiba (6), Mato Grosso do Sul (6) e Rocha/Treinta y Tres (6); e para tipo de grão foram Minas Gerais (6), Rio Grande do Sul (5), Paraiba (5), Mato Grosso do Sul (5) e Tacuarembó/Rivera (5).

O índice de Shannon, calculado com base nos dez descritores fenotípicos qualitativos (textura da cor do grão, cor do grão, tipo do grão, forma da espiga, arranjo dos grãos na fileira, cor do sabugo, cor do pericarpo, cor do endosperma, forma do grão, forma da borda do grão), apresentou os maiores valores em Minas Gerais (1,20), Rio Grande do Sul (1,15), Rocha/Treinta y Tres (1,08) e Paraiba (1,03).

A presente pesquisa caracterizou as raças de milho com base em 19 descritores, os quais de forma combinada conferiram identidade a distintos grupos de variedades. A raça de milho é um conjunto de variedades com características genéticas comuns, adaptada a determinadas condições ambientais associadas a certos contextos sociais e culturais (Lima, 2016). No total, foram identificadas 25 raças de milho no Brasil e 11 no Uruguai. A riqueza de raças por região variou de 1 a 14, sendo que as maiores riquezas foram identificadas no Rio Grande do Sul (14), Minas Gerais (10) e Rocha (8). As regiões que apresentaram as maiores riquezas de raças exclusivas foram Rio Grande do Sul (7), Minas Gerais (4) e Mato Grosso do Sul (3).

4.3.3. Indicadores moleculares do milho em regiões das terras baixas da América do Sul

Os indicadores moleculares avaliados envolveram os seguintes parâmetros de diversidade: índice de diversidade genética de Nei (1978) (ou heterozigosidade esperada) e heterozigosidade observada. Também foram estimados, neste estudo, o número total de alelos e coeficiente de endogamia. Os valores de H_O e D, de forma geral, apresentaram-se elevados, com os maiores índices observados em Canelones (H_O=0,333 e D=0,219), Tacuarembó/Rivera (H_O=0,302 e D=0,214), Minas Gerais (H_O=0,281 e D=0,205), Paraiba (H_O=0,243 e D=0,188) e Rocha/Treinta y Tres (H_O=0,230 e D=0,196). Os menores valores foram observados no Mato Grosso do Sul e Rondônia (H_O=0,181 e D=0,176). O número total de alelos variou de 7.307 a 9.514, sendo o menor valor observado em Rondônia (7.307) e os maiores em Minas Gerais (9.514), Rio Grande do Sul (9.448) e Tacuarembó/Rivera (9.399). O coeficiente de endogamia variou de -0,5231 a -0,0266. Os valores negativos para este parâmetro, observados em todas as regiões, indica um excesso de heterozigotos.

4.3.4. Ferramenta metodológica para identificação dos microcentros de diversidade do milho

Com base nos indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares, foram calculados distintos índices de diversidade genética (Tabela 4) com o propósito de mensurar e comparar a diversidade do milho presente nas regiões, bem como obter parâmetros médios para caracterizar/identificar os micro-centros de diversidade do milho nas terras baixas da América do Sul. Foram gerados os índices "Índice Etno", "Índice Feno" e "Índice Mol", a partir dos respectivos indicadores.

Os maiores valores do Índice Etno foram diagnosticados nas seguintes regiões: Minas Gerais (2,61), Rio Grande do Sul (2,52), Mato Grosso do Sul (2,19) e Rondônia (2,13); do Índice Feno, foram no Rio Grande do Sul (1,39), Minas Gerais (1,35), Tacuarembó/Rivera (1,26) e Mato Grosso do Sul (1,18); e do Índice Mol, foram em Canelones (0,276), Tacuarembó/Rivera (0,258), Minas Gerais (0,243) e Rio Grande do Sul (0,228). Considerando o Índice Etno a região que apresentou o menor valor possui 53,64% do valor máximo observado; para o Índice Feno observou-se o valor de 55,40%; e para o Índice Mol, 46%.

De forma geral, considerou-se os "índices Etno", "índices Feno" e "índices Mol" elevados, por apresentarem cerca de 50% dos valores máximos observados. Todos os parâmetros avaliados em conjunto retrataram uma expressiva diversidade de variedades locais de milho, caracterizada pela riqueza e presença de variedades exclusivas, em todas as regiões. Todos estes elementos encontraram-se envolvidos em um dinâmico contexto sociocultural demonstrado pela caracterização etnobotânica, o qual apresentou especificidades regionais.

Tabela 4. Índices de diversidade genética do milho gerados com base nos indicadores etnobotânicos (índice de Shannon - H'), fenotípicos (índice de Shannon - H'), moleculares (índice de Nei, 1978 e H_O), índice Etno, índice Feno e índice Mol em diferentes regiões das terras baixas da América do Sul.

Região		Índices Etnobotânicos (H')							Índices Fenotípicos (H')						Índices Moleculares		
		NVA	*RNL*	*RNE*	*RU*	*RO*	*TM*	*Índice Etno*	*RCG*	*RTG*	*H'DQ*	*RR*	*RE*	*Índice Feno*	*D*	*Ho*	*Índice Mol*
Brasil	Mato Grosso do Sul	3	2,79	2,49	1,84	2,10	0,90	2,19	1,54	1,47	0,89	1,38	0,64	1,18	0,176	0,181	0,178
	Minas Gerais	4	3,50	3,25	1,86	1,86	1,17	2,61	1,61	1,57	1,20	1,53	0,86	1,35	0,205	0,281	0,243
	Paraiba	2	2,19	1,91	1,66	1,66	1,31	1,79	1,36	1,16	1,03	0,31	0	0,77	0,188	0,243	0,216
	Rio Grande do Sul	3	3,37	3,19	2,17	2,17	1,23	2,52	1,58	1,10	1,15	1,93	1,22	1,39	0,202	0,254	0,228
	Rondônia	3	2,65	2,26	1,79	1,79	1,30	2,13	1,39	0,69	0,84	0	0	0,58	0,123	0,130	0,127
Uruguai	Canelones	1	1,84	1,39	1,43	1,43	1,31	1,40	1,03	1,36	0,78	1,81	0	1,00	0,219	0,333	0,276
	Rocha/Treinta y Tres	2	3,09	2,81	1,69	1,69	1,21	2,08	1,51	1,27	1,08	1,97	0	1,16	0,196	0,230	0,213
	Tacuarembó/Rivera	2	2,52	1,98	1,58	1,58	1,24	1,82	1,48	1,46	0,93	1,75	0,69	1,26	0,214	0,302	0,258

Indicadores etnobotânicos: número médio de variedades por agricultor (*NVA*), riqueza de nomes locais (*RNL*), riqueza de nomes exclusivos (*RNE*), riqueza de usos gastronômicos (*RU*), riqueza de origem (*RO*), tempo médio de cultivo (*TM*); Indicadores fenotípicos: riqueza de cor de grão (RCG); riqueza de tipo de grão (RTG); riqueza raças (*RR*); riqueza de raças exclusivas (*RE*); índice de Shannon (*H'DQ*); Indicadores moleculares: índice de diversidade genética de Nei, 1978 (*D*) e heterozigosidade observada (H_O); Índice de diversidade genética gerado a partir do valor médio dos índices etnobotânicos (Índice Etno), índice de diversidade genética gerado a partir do valor médio dos índices fenotípicos (Índice Feno) e índice de diversidade genética gerado a partir do valor médio dos índices moleculares (Índice Mol).

4.3.5. Diagnóstico das fortalezas, oportunidades, fragilidades e ameaças para a conservação da agrobiodiversidade nas terras baixas da América do Sul

O diagnóstico das *fortalezas, oportunidades, fragilidades* e *ameaças* foi realizado com o intuito de identificar os principais desafios que os agricultores enfrentam na conservação da agrobiodiversidade, sobretudo, em relação às variedades locais, em comunidades de agricultores familiares do Brasil e Uruguai. A ferramenta permitiu identificar 77 tópicos de discussão para as *forças*, 65 para as *fragilidades*, 58 para as *oportunidades* e 57 para as *ameaças* na conservação da agrobiodiversidade, os quais totalizaram 257 tópicos indicados e discutidos pelos agricultores (Tabela 5). A frequência absoluta das *forças* e *oportunidades* foram superiores à frequência das *fragilidades* e *ameaças*.

Tabela 5. Principais tópicos de discussão do diagnóstico das *fortalezas, oportunidades, fragilidades* e *ameaças* para a conservação da agrobiodiversidade nas terras baixas da América do Sul.

Diagnóstico	Principais tópicos de discussão indicados pelos agricultores
Forças (internas)	*Parcerias existentes que apoiam o trabalho da conservação de variedades crioulas; Apoio das Universidades; Produção de Alimento saudável; Artesanato; Reconhecimento do trabalho dos Guardiões; Boa organização do grupo dos guardiões; Relevo favorece a conservação das variedades locais; Pesquisas diversas sobre a agrobiodiversidade; Quantidade de variedades (riqueza); Diversificação da produção; Soberania e segurança alimentar (se planta para o consumo); Clima da região: propício para a produção e conservação das sementes; Associação das Mulheres Agricultoras está crescendo; Rituais tradições, usos na culinária indígena; Datas comemorativas e festa das sementes indígenas; Interação entre o conhecimento tradicional e científico; Intercâmbios de sementes e saberes; Agricultura Familiar; Os jovens estão começando a acreditar no valor das sementes crioulas; Ter a própria semente (a semente é nossa); Pastoral da Juventude Rural.*
Fragilidades (internas)	*Falta de projetos e incentivos públicos para as associações locais; Não ter bancos comunitários de sementes; Dificuldade em manter muitas variedades (cruzamento); Monocultura do fumo, da soja; Trabalho manual e oneroso no campo; Produtividade baixa; Êxodo rural (poucas famílias nas aldeias, migração para as cidades; Falta de assistência técnica e acompanhamento especializado; Falta de água (estão há 16 anos sem água no Assentamento Rancho Loma); Acesso limitado às sementes crioulas; Necessidade de encontrar ou construir um nicho de mercado que valorize os produtos agroecológicos; Pressão dos técnicos da Emater e Agropecuárias para plantar sementes convencionais; Descrença que a agricultura e a medicina alternativa realmente funcionam; A invasão do agronegócio; Sementes transgênicas; Concorrência desleal com o mercado.*
Oportunidades (externa)	*Muitas possibilidades de acesso ao conhecimento (parceria com as Universidades, Emater); Encontros de Trocas de experiências; Aprender novas técnicas; Pesquisas; Aumento da produção de sementes; As associações incentivam outros que ainda não plantam variedades locais a começar a plantar; Artesanato como fonte de renda; Geração de renda pela venda de sementes, farinha, milho verde e outros; Participação em congressos e eventos; Valorização dos produtos crioulos/orgânicos (exemplo araruta); Desenvolvimento da agroecologia; Políticas de compras públicas como mecanismo de valorização das sementes crioulas; Resgate das variedades locais; Consumidor consciente.*
Ameaças (externa)	*Não tem leis que protegem as sementes crioulas; Aplicação de agrotóxicos; Invasão das sementes transgênicas; As intempéries da natureza podem provocar perda de variedades (como clima, seca e ventania); Falta de apoio em financiamentos agrícolas; Políticas Públicas em torno das Terras Indígenas; Insegurança territorial; Mudanças climáticas; Cruzamentos com outras variedades; Encurralamento dos assentamentos pelas monoculturas; Mercado de sementes (monopólio); Não diversificação da produção; Legislações voltadas para o agronegócio; Falta de saúde para trabalhar; Ganância do povo; Privatização das águas.*

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Indicadores que moldam a diversidade genética de variedades locais de milho em distintas regiões das terras baixas da América do Sul

Os indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares apresentaram ampla diversidade de milho, os quais permitiram identificar micro-centros de diversidade da espécie, em diferentes regiões das terras baixas da América do Sul. A presente pesquisa envolveu diferentes contextos eco-geográficos e biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa), bem como contextos socioculturais, dentro dos quais foram englobados distintos perfis de agricultores familiares: agricultores tradicionais, quilombolas, assentados de reforma agrária, ribeirinhos e indígenas. Todos estes elementos, componentes ambientais e humanos, atuam no processo de diversificação e moldam a diversidade de variedades locais presente em cada local. Cada região apresenta peculiaridades intrínsecas, o que torna cada lugar particular no âmbito da conservação.

As regiões de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rocha/Treinta y Tres apresentaram os maiores valores de riqueza de nomes locais. Todas as regiões envolvidas na pesquisa apresentaram nomes locais exclusivos da região, que variou de 4 (Canelones) a 33 (Minas Gerais) dentre as regiões, totalizando 134 nomes locais exclusivos distribuídos em todas as áreas. Este resultado indica que em cada local existe uma diversidade própria, já que o nome da variedade é considerado um indicador de diversidade e um importante marcador de caracterização da diversidade, por remeter (i) às características fenotípicas da variedade, tais como os nomes “Branco”, “Palha Roxa”, “Vermelho”, “Oito Carreiras”, “Duro”, “Colorado”; (ii) à origem geográfica como “Caiano de Sobrália”, “Maranhão”, “Mato Grosso”; (iii) ou aos usos, como “Maisena”, “Pipoca”, “Amarillo Dulce”, “Forrajera Blanca”.

Os indicadores fenotípicos apresentaram elevada riqueza e diversidade genética avaliada por meio de distintos descritores do milho. As regiões que apresentaram os maiores valores para o índice de Shannon foram Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rocha/Treinta y Tres e Paraiba. A maior riqueza de raças foi observada no Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Rocha/Treinta y Tres; e a maior riqueza de raças exclusivas foi observada no Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Os valores do índice de Shannon para cor do grão apresentaram-se superiores aos valores observados para o micro-centro de Santa Catarina (0,73) (Costa et al., 2017) em todas as regiões, exceto em Rondônia, assim como para tipo de grão (1,4), exceto em Rondônia, Paraíba e Canelones. No entanto, é valido ressaltar que a metodologia de caracterização deste micro-centro foi realizada com base no conhecimento dos agricultores e não por meio dos descritores da cultura, tal como realizado na presente pesquisa.

Os indicadores moleculares, de forma geral, apresentaram-se elevados. O coeficiente de endogamia negativo indicou um excesso de heterozigotos em todas as regiões, o que pode ser consequência dos sistemas de cultivo e manejo dinâmicos, dentro do qual as variedades locais de milho estão submetidas, sob constante diversificação e fluxo gênico (Louette et al., 1997; Louette e Smale, 2000). Os coeficientes de endogamia negativos, estimados por meio de marcadores SNPs, também foram observados em variedades locais de milho coletadas diretamente de agricultores no México, onde os valores variaram de -0,928 a 0,225 (Arteaga et al., 2016). Os valores da *He*, correspondentes aos valores do *D* apresentados neste

estudo, apresentaram-se mais elevados no México, os quais variaram de 0,234 a 0,318 (Arteaga et al., 2016), o que é esperado por corresponder à região onde se originou o processo de domesticação e diversificação do milho (Kistler et al., 2018).

A caracterização etnobotânica apresentou aspectos sociais e culturais relacionados à conservação das variedades locais de milho nas regiões. As variedades locais são utilizadas, principalmente, para autoconsumo relacionado à alimentação das famílias e dos animais, e apresentaram um amplo potencial de usos alimentares, culinários e até medicinais. Os usos das variedades são inerentes às estratégias alimentares dos agricultores. Se eles não cultivam as variedades locais por algum motivo ou por não possuírem algum valor de uso, as variedades tendem a desaparecer ao longo do tempo. A preferência do agricultor por uma variedade local devido às suas distintas qualidades de uso final é um fator importante que influencia no processo de decisão de conservar ou não essa variedade e, consequentemente, afeta na conservação da diversidade genética (Shewayrga e Sopade, 2011).

As sementes são obtidas por diferentes fontes, as quais viabilizam a manutenção da diversidade por meio de um sistema dinâmico dentro do qual os agricultores obtêm as sementes para o cultivo (Louette et al., 1997). Os resultados de origem das variedades indicaram que a maior parte das redes de sementes são basicamente locais e familiares, entre vizinhos ou por meio de encontros que possuam essa finalidade, os quais promovem um processo de conservação coletivo. Se uma mesma variedade passa a ser mantida por mais de um agricultor, consequentemente seu risco de perda se reduz pela metade. No entanto, também se observou fluxos migratórios inter-regionais de variedades locais de milho, ao longo dos últimos 100 anos. À medida que promove o fluxo genético, a introdução de materiais de outras localidades pode incrementar a diversidade local (Louette et al., 1997). Estes eventos de dispersão recente ampliaram a diversidade genética nas regiões indicadas como micro-centros de diversidade, por meio da introdução de variedades locais provenientes de outras regiões do Brasil e até de outros países da América do Sul.

O tempo de cultivo das variedades locais está associado à adaptação das mesmas às condições ecológicas e socioculturais da região a qual estão inseridas e é considerado um importante componente no processo de evolução e diversificação das variedades locais (Zeven, 1998; Louette et al., 1997). A presente pesquisa identificou um tempo de cultivo mínimo, médio e máximo de 1, 15 e 100 anos, respectivamente. Os tempos mínimo, médio e máximo identificados no micro-centro de diversidade de milho, no Sul do Brasil, foram de 1, 10 e 100 anos, respectivamente (Costa et al., 2017). Bellon et al. (2003) observaram 1, 25 e 67 anos nos Vales Centrais de Oaxaca, México. O estado de Rondônia apresentou o maior tempo médio (36 anos) em relação as demais regiões da pesquisa, e as regiões do Mato Grosso do Sul e Minas Gerais apresentaram o maior tempo máximo (100 anos). Rondônia encontra-se localizada em ambiente amazônico, dentro do qual as variedades são cultivadas na “Mata”, por meio de um sistema de agricultura conhecido como coivara.

Observou-se que os principais sistemas agrícolas são manejados na “Roça/Lavoura (78%)” ou no Quintal (18%). Nestes sistemas os principais critérios utilizados pelos agricultores para selecionar suas sementes estão relacionados ao tamanho da espiga, uniformidade dos grãos e sanidade da espiga. A maior parte destes critérios associaram-se às características da espiga e do grão, contemplando os descritores científicos chaves para a caracterização das raças de milho (Bird e Goodman, 1977). Isso mostra que a seleção realizada pelos agricultores pode possibilitar tanto a manutenção quanto o aumento da diversidade

genética das variedades ao longo das gerações, conforme o objetivo e o direcionamento da seleção. Características de interesse podem ser selecionadas pelos agricultores a partir da diversidade genética cujos valores adaptativos e agronômicos favorecem sistemas agrícolas estáveis e produtivos.

Durante as expedições de campo, a presença de parentes silvestres do milho foi relatada no Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e no Uruguai. No entanto, outras pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de aprofundar os estudos sobre a presença de parentes silvestres de milho nestas regiões. No micro-centro de diversidade de milho localizado em Santa Catarina, no Sul do Brasil, foi identificada a presença do teosinto coexistindo com uma ampla diversidade de variedades locais de milho (Silva et al., 2015; Costa et al., 2017). A espécie silvestre foi classificada como *Zea luxurians* (Durieu and Ascherson) Bird e apresenta uso forrageiro apontado pelos agricultores da região (Silva et al., 2015). A pesquisa constatou que houve uma introdução institucional da espécie no país, que ocorreu em torno da década de 1930. O milho continuou seu processo de evolução na ausência de seus parentes silvestres, fora do seu centro de origem, por milhares de anos (Warbouton et al., 2011; Kistler et al., 2018). Estas evidências demonstram que, atualmente, uma ampla diversidade de variedades locais de milho está coexistindo com populações introduzidas de parentes silvestres nas terras baixas da América do Sul, fora do México e da América Central.

4.4.2. Micro-centros de diversidade genética do milho nas terras baixas da América do Sul

Os indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares apresentaram ampla diversidade genética do milho, conservada em todas as regiões da pesquisa. A exclusividade de nomes locais indica a presença de variedades únicas em cada localidade. Estas informações demonstram a importância do papel de todas as regiões enquanto reservatórios genéticos, os quais não devem ser negligenciados e merecem atenção dentro dos programas de conservação de recursos genéticos. A identificação de micro-centros de diversidade é relevante porque atribui respaldo e reconhecimento cientifico a estas áreas, com base em critérios analíticos, e pode subsidiar políticas públicas que envolvam estas áreas.

O micro-centro de diversidade de milho, localizado em Santa Catarina, foi identificado considerando os seguintes critérios: i) a região apresenta um elevado número de diferentes variedades locais e contempla populações de parentes silvestres de milho; ii) as variedades locais da região estão submetidas aos processos de diversificação, que por sua natureza estão relacionados à atividade humana e a aspectos socioculturais e; iii) a região corresponde a uma área geográfica pequena, onde existe diversidade morfológica de milho e populações de parentes silvestres (Costa et al., 2017). A ocorrência de parentes silvestres em convivência simpátrica com a espécie cultivada é um aspecto relevante sob o ponto de vista da evolução e conservação. No entanto, é importante ressaltar que para uma região ser considerada microcentro de diversidade não é obrigatório que a espécie domesticada coabite com os seus parentes silvestres.

Para determinar os micro-centros de diversidade de milho a presente pesquisa levou em consideração os indicadores etnobotânicos, fenotípicos e moleculares para caracterizar as regiões, os quais identificaram: i) riqueza e diversidade genética de variedades locais (a maior parte exclusiva às respectivas regiões); ii) variedades locais sob diversificação devido a ação humana corrente diagnosticada pelos

aspectos socioculturais (origem, tempo de cultivo, usos e manejo); e iii) diversidade genética diagnosticada por meio de índices etnobotânicos, fenotípicos e moleculares, os quais indicaram áreas de conservação e acumulação de germoplasma de milho, em escala microrregional. A partir destes critérios, todas as regiões envolvidas na presente pesquisa foram consideradas micro-centros de diversidade do milho nas terras baixas da América do Sul. Esta abordagem metodológica, bem como os valores dos índices de diversidade identificados, poderão ser úteis e servirem de referência para a realização de outros estudos que visam a identificação de micro-centros de diversidade de milho em outras regiões.

Um micro-centro de diversidade de batata foi identificado em Cochabamba, na Bolivia (Terrazas e Valdivia, 1998), caracterizado pela variabilidade morfológica e de usos, bem como pela distribuição espacial na região. Esta indicação subsidiou outra pesquisa realizada com o intuito de fortalecer a conservação *in situ-on farm* e ampliar o conhecimento da diversidade de batatas nessa área (Terrazas et al., 2005). Um mosaico de concentração de recursos genéticos foi proposto na Amazônia, o qual envolveu a presença de quatro 'centros menores' de diversidade, dentro dos quais pressupõe-se a presença das seguintes espécies: *Zea mays, Manihot esculenta, Gossypium barbadense, Bixa orellana, Ananas comosus, lpomoea batatas, Genipa americana* e *Nicotiana tabacum* (Clement, 1999). Diversos estudos relataram a diversidade de variedades locais de milho conservadas *in situ-on farm* em distintas regiões, como no Peru (Zimmerer, 1991), México (Perales et al., 2003; Bellon et al., 2003; Pressoir e Berthaud, 2004; Dzib-Aguilar et al., 2016), Portugal (Carvalho et al., 2008) e Brasil (Costa et al., 2017; Silva et al., 2017).

Um estudo recente realizado na região do Mediterrâneo desenvolveu uma abordagem metodológica e propôs dois modelos para identificação de *hotspots* de agrobiodiversidade, um modelo restritivo e outro aditivo, os quais identificaram 57 e 197 *hotspots*, respectivamente (Pacicco et al., 2018). Estes modelos levaram em consideração os seguintes aspectos: i) diversidade de variedades locais; ii) presença de parentes silvestres; e iii) diversidade ecológica de agroecossistemas. Esta pesquisa também gerou índices considerando os fatores já mencionados e determinou pontos de cortes para determinar as regiões consideradas *hotspots*. No entanto, os autores salientam que estimar um ponto de corte certo e determinar medidas de diversidade não é um método simples. Esse estudo, buscou, principalmente, definir um método para priorizar áreas de interesse para a conservação e não descobrir áreas mais ou menos diversas. Os autores ainda consideram quaisquer outros critérios relativos à avaliação da agrobiodiversidade válidos e devem ser considerados quando pertinentes.

O diagnóstico das *fortalezas, oportunidades, fragilidades* e *ameaças* foi realizado com o intuito de identificar os principais desafios para a conservação da agrobiodiversidade. As *forças* e as *oportunidades* fortalecem a conservação das variedades locais nas regiões. Os locais envolvidos na pesquisa destacaram-se pela produção local de sementes crioulas, diversificação da produção agrícola, por abrigar organizações de agricultores familiares que atuam na conservação dos saberes tradicionais, na busca de conhecimentos sobre práticas agroecológicas, no desenvolvimento de ações que promovam a troca de experiências entre os agricultores e na valorização do alimento saudável. As principais dificuldades (*fragilidades* e *ameaças*) para a conservação estão associadas, principalmente, à falta de projetos e incentivos públicos para as associações locais, às monoculturas e invasão das sementes transgênicas, ao êxodo rural, ao afastamento dos jovens do campo, ao acesso à água potável e à insegurança territorial (no caso das comunidades indígenas).

As regiões indicadas como micro-centros de diversidade neste estudo conservam uma importante diversidade de variedades locais e raças de milho. Estas regiões englobam variedades exclusivas e raças de origem indígena consideradas raras tanto em áreas de cultivo *on-farm* quanto nos bancos de germoplasma. O entorno destas zonas é caracterizado pela expansão das grandes áreas de monocultura. A diversidade genética do milho encontra-se vulnerável a perdas dentro do sistema agrícola devido a substituição das variedades locais por cultivares comerciais, em consequência da industrialização da agricultura (Brush, 2000). A pesquisa identificou os principais desafios (*fragilidades* e *ameaças*) para a conservação da agrobiodiversidade nas regiões que envolvem os micro-centros sugeridos. Por estarem localizadas em zonas vulneráveis à erosão genética, o presente estudo também sugere estas regiões como *hotspots* de agrobiodiversidade. As regiões que envolvem o Mato Grosso do Sul, Minas gerais, Rio Grande do Sul (Myers et al., 2000) e Rondônia (Myers, 1988) já se encontram contempladas nas zonas indicadas como *hotspots* de diversidade.

Em Rondônia, estado localizado no Sudoeste da Amazônia, a pesquisa foi realizada dentro de uma Reserva Agroextrativista (RESEX), caracterizada pela presença de agricultores ribeirinhos. Esta região é considerada muito importante no processo de evolução do milho, pois evidências apontam que a espécie chegou no local em estado parcial de domesticação (Kistler et al., 2018), e tem sido reconhecida como centro de diversificação do milho (Hilbert et al., 2017; Kistler et al., 2018) e de outras espécies cultivadas como arroz (Hilbert et al., 2017), amendoim, mandioca, pimenta (Hilbert et al., 2017; Watling et al., 2018), abóbora e feijão (Watling et al., 2018). No entanto, devido aos eventos de conquista e colonização européia e à dizimação das populações indígenas no local (Mann, 2005), a região sofreu consequências de perda e extinção dos recursos genéticos (Clement, 1999), os quais podem englobar as raças locais de milho (Brieger et al., 1958; Bedoya et al., 2017).

O Mato Grosso do Sul está localizado no bioma Cerrado. Os participantes desta região envolveram agricultores familiares, assentados de reforma agrária e indígenas. As comunidades rurais desta região contam com a presença de três bancos de sementes comunitários, localizados nos municípios de Juti, Caarapó e Sidrolândia. A região de Minas Gerais envolvida no estudo encontra-se na Zona da Mata, no bioma Mata Atlântica. Um histórico de iniciativas locais contribuiu para o desenvolvimento da agroecologia e da conservação de variedades locais na região, a qual foi reconhecida legalmente, em 2018, como Polo Agroecológico e de Produção Orgânica (Minas Gerais, 2018). No Rio Grande do Sul, a pesquisa envolveu o município de Ibarama, caracterizado pelo Écotono Mata Atlântica-Pampa. O município é fortemente marcado pela ampla presença de agricultores familiares, engajados em um movimento histórico que visa promover a conservação da agrobiodiversidade, com o apoio das organizações locais. No bioma Caatinga, a pesquisa foi realizada na região da Serra da Borborema. A região envolve uma rede constituída por 63 bancos comunitários familiares, mobilizada pela articulação dos agricultores e organizações locais, com forte apelo colaborativo, como estratégia de convivência com o Semi-Árido. Os agricultores locais têm discutido a indicação de comunidades livres de transgênicos no território.

No Uruguai, a indicação de micro-centros de diversidade de milho é inédita. Todo o país está envolvido pelo bioma Pampa, dentro do qual o departamento de Rocha apresenta o maior número de unidades de conservação. Em Rocha, registros arqueológicos de milho, com datação de 4.190 anos AP (Iriarte et al., 2004), indicam a presença antiga da espécie na região. No departamento de Canelones, a

Instituição Nacional de Direitos Humanos e Ouvidoria declarou uma área livre de soja transgênica. Este processo pode abrir espaço para o desenvolvimento desta discussão também envolvendo a cultura do milho. Rivera e Tacuarembó correspondem a regiões de fronteira e foram os únicos locais onde foram identificados os milhos farináceos do Uruguai.

Em todas as regiões envolvidas na pesquisa, existem iniciativas históricas fomentadas pelos agricultores familiares, com o apoio de organizações locais, cujo objetivo comum é promover a conservação da agrobiodiversidade. A indicação destas regiões como micro-centros de diversidade fortalece as iniciativas locais que já existem e fortalecem os processos vinculados à conservação da agrobiodiversidade. A conservação *in situ-on farm* das variedades locais de milho realizada pelos agricultores trazem benefícios às comunidades rurais, ao meio ambiente e se relacionam também aos serviços ecossistêmicos (Millennium Ecosystem Assessment, 2005; Wallace, 2007; Raymond et al., 2009). O diagnóstico das *fortalezas* e oportunidades apresentou elementos os quais oferecem benefícios às comunidades rurais. Estes elementos são envolvidos pelas relações sociais e culturais de cada local e fortalecem a segurança e a soberania alimentar nas regiões.

Os serviços ecossistêmicos correspondem aos benefícios da natureza para as sociedades humanas. Além de proporcionar o bem-estar às pessoas, estimulam as atividades econômicas locais. Existem três categorias de serviços ecossistêmicos: provisão, regulação e culturais (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Os serviços de provisão estão relacionados aos "produtos" que as pessoas obtêm da natureza, tais como alimentos, água, fibra, sementes e plantas medicinais. Os serviços de regulação envolvem as funções dos ecossistemas como reguladores das condições naturais ambientais. No caso da presente pesquisa, que abarca agroecossistemas, os serviços de regulação associam-se ao controle de erosão e manutenção da fertilidade dos solos, controle biológico de praga e doenças, polinização e dispersão de sementes, sistemas de cultivo sustentáveis e produtivos. Por último, os serviços culturais representam benefícios não-materiais, relacionados à cultura e às relações sociais, como patrimônio cultural, identidade cultural, conservação da paisagem, valor científico e educacional dos agroecossistemas, incluindo a identidade espiritual e religiosa. A identificação de micro-centros de diversidade, além de corresponder a uma estratégia de conservação *in situ-on farm*, também indica zonas de serviços ecossistêmicos associados às variedades locais.

A presente pesquisa sugere a realização de novos estudos em outras áreas potenciais com o intuito de expandir a identificação de micro-centros de diversidade, tanto do milho, quanto de outras espécies cultivadas. Estas regiões poderão ser reconhecidas como reservas ou zonas de agrobiodiversidade (Santilli, 2011), as quais correspondem a uma categoria de unidade de conservação que visa promover a conservação e o manejo sustentável da agrobiodiversidade, tal como ocorre atualmente com as Unidades de Conservação. A indicação dos micro-centros de diversidade do milho pode subsidiar o desenvolvimento de estratégias de conservação e políticas públicas que visem a conservação dos recursos genéticos da espécie nas terras baixas da América do Sul.

REFERÊNCIAS

Arteaga, M. C.; Moreno-Letelier, A.; Mastretta-Yanes, A.; Vázquez-Lobo, A.; Breña-Ochoa, A.; Moreno-Estrada, A.; Eguiarte, L. E.; Piñero, D. (2016) Genomic variation in recently collected maize landraces from Mexico. *Genomics Data* 7: 38-45.

Bedoya, C.A.; Dreisigacker, S.; Hearne, S.; Franco, J.; Mir, C.; Prasanna, B. M; Taba, S.; Charcosset, A.; Warburton, M. L. (2017) Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PLoS One* 12(4): e0173488.

Bellon, M. R.; Berthaud, J.; Smale, M.; Aguirre, J. A.; Taba, S.; Aragon, F.; Diaz, J.; Castro, H. (2003) Participatory landrace selection for on-farm conservation: an example from the Central Valleys of Oaxaca, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50:401-416.

Bird, R. M.; Goodman, M. M. (1977) The races of maize V: grouping maize races on the basis of ear morphology. *Economic Botany* 31: 471-481.

Brieger, F.G.; Gurgel, J.T.A.; Paterniani, E.; Blumenchein, A.; Alleoni, M.R. (1958) Races of maize in Brazil and other eastern South American Countries. National Academic of Sciences, Washington DC.

Brush, S. B. (2000) Genes in the field: on-farm conservation of crop diversity. Lewis Publishers, Boca Raton.

Carvalho, M.A.P.; Ganança, J.F.T.; Abreu, I.; Sousa, N.F.; dos Santos, T.M.M.; Vieira, M.R.C.; Motto, M. (2008) Evaluation of the maize (*Zea mays* L.) diversity on the Archipelago of Madeira. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:221-233.

Convention on Biological Diversity CBD. (1992) Text and Annexes, Montreal; 1992. Disponível em: http://www.cbd.int/convention/.

Clement, C.R. (1999) 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. *Economic Botany* 53:188-202.

Costa, F.M.; Silva, N.C.A.; Ogliari, J.B. (2017) Maize diversity in southern Brazil: indication of a microcenter of *Zea mays* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 64(4):681-700.

De María, F.; Fernández, G.; Zoppolo, G. (1979) Caracterización agronómica y clasificación racial de las muestras de maíz colectadas en Uruguay bajo el Proyecto IBPGR y Facultad de Agronomía. Tesis (Ingeniería Agronómica). Universidad de la República, Uruguay.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. (1990) Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1):13-15.

Dzib-Aguilar, L. A.; Ortega-Paczka, R.; Segura-Correa, J. C. (2016) *In situ* conservation and participative improvement of creole maize in the Peninsula de Yucatan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 19: 51-59.

Goudet, J. (2005) Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5(1):184-186.

Gower, J. C. A. (1971) General coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27:857-871.

Hammer, Ø.; Harper, D.; Ryan, P. D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:1-9.

Harlan, J.R. (1971) Agricultural origins: centers and noncenters. *Science* 174: 468-173.

Harlan, J.R. (1992) Crops and man. American Society of Agronomy/Crop Science Society of America, 2ed., Madison, Wisconsin.

Hawkes, J. G. (1983) The diversity of crop plants. Harvard University Press, Cambridge.

Hilbert, L.; Neves, E.G.; Pugliese, F.; Whitney, B.S.; Shock, M.; Veasey, E.; Zimpel, C.A.; Iriarte, J. (2017) Evidence for mid-Holocene rice domestication in the Americas. *Nature Ecology & Evolution* 1:1693-1698.

Kamvar, Z. N.; Tabima, J. F.; Grünwald, N. J. (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281.

Kato, T.A.; Mapes, C.; Mera, L.M.; Serratos, J.A.; Bye, R.A. (2009) Origen y diversificacion del maiz: una revision analítica. (1st ed.). Universidad Autónoma de México, Ciudad de México.

Kistler, L.M.; Maezumi, S.Y.; de Souza, J.G.; Przelomska, N.A.S.; Costa, F.M.; Smith, O.; Loiselle, H.; Ramos-Madrigal, J.; Wales, N.; Ribeiro, E.; Grimaldo, C.; Prous, A.P.; Gilbert, M.; Thomas P.; de Oliveira, F.F.; Allaby, R.G. (2018) Multi-proxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. *Science* 362:1309-1313.

Iriarte, J.; Holst, I.; Marozzi, O.; Listopad, C.; Alonso, E.; Rinderknecht, A.; Montaña, J. (2004) Evidence for cultivar adoption and emerging complexity during the mid-Holocene in the La Plata Basin, Uruguay. *Nature* 432:614-617.

Lima (2016). Reunião do Ministerio del Ambiente do Peru. Seminário y Taller Internacional Clasificación Racial de la Diversidad del Maíz Peruano con fines de Bioseguridad. Ata firmada 10 de Agosto, Lima, Peru.

Louette, D.; Charrier, A.; Berthaud, J. (1997) In situ conservation of maize in Mexico: genetic diversity and maize seed management in a traditional community. *Economic Botany* 51: 20-38

Louette, D.; Smale, M. (2000) Farmers' seed selection practices and traditional maize varieties in Cuzalapa, Mexico. *Euphytica* 113: 25-41.

Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Struyf, A.; Hubert, M.; Hornik, K. (2015) Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.0.1.

Mann, C. C. (2005) 1491: New revelations of the Americas before Columbus. NY: Vintage , New York.

Matsuoka, Y.; Vigouroux, Y.; Goodman, M. M.; Sánchez, J. J.; Buckler, E.; Doebley, J. F. (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:6080-6084.

Millennium Ecosystem Assessment. (2005) Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC.

Minas Gerais (2018). Lei nº 23.207, de 27 de dezembro de 2018, institui o Polo Agroecológico e de Produção Orgânica na região da Zona da Mata. Disponível em:< http://leisestaduais.com.br/mg/lei-ordinaria-n-23207-2018-minas-gerais-institui-o-poloagroecologico-e-de-producao-organica-na-regiao-da-zona-da-mata>. Acesso em: 02 março 2020.

Mir, C.; Zerjal, T.; Combes, V.; Dumas, F.; Madur, D.; Bedoya, C.; et al. (2013) Out of America: tracing the genetic footprints of the global diffusion of maize. *Theoretical and Applied Genetics* 126:2671-2682.

Mojena, R. (1977) Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. *Computer Journal* 20:359-363.

Myers, N. (1988) Threatened biotas: "Hot spots" in tropical forests. *Environmentalist* 8:187-208.

Myers, N. (1990) The biodiversity challenge: Expanded hot-spots analysis. *Environmentalist* 10:243-256.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Da Fonseca, G. A. B.; Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.

Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.

Oksanen, J.; Blanchet, F. G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P.; et al. (2016) Vegan: community ecology package. R package version 2.3-5. R Foundation, Vienna, Austria.

Pacicco, L.; Bodesmo, M.; Torricelli, R.; Negri, V. (2018) A methodological approach to identify agro-biodiversity hotspots for priority *in situ* conservation of plant genetic resources. *PLoS ONE* 13(6): e0197709.

Paterniani, E.; Goodman, M.M. (1977) Races of maize in Brazil and adjacent areas. CIMMYT, Mexico City.

Perales, R. H.; Brush, S. B.; Qualset, C. O. (2003) Dynamic management of maize landraces in central Mexico. *Economic Botany* 57:21–34.

Pressoir, G.; Berthaud, J. (2004) Patterns of population structure in maize landraces from the Central Valleys of Oaxaca in Mexico. *Heredity* 92:88–94.

R Development Core Team. (2015). *R:* A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available in: http://www.R-project.org/

Raymond, C. M.; Bryan, B. A.; MacDonald, D. H.; Cast, A.; Strathearn, S.; Grandgirard, A.; Kalivas, T. (2009) Mapping community values for natural capital and ecosystem services. *Ecological Economics* 68(5): 301-1315.

Santilli, J. (2011) Agrobiodiversity and the law: regulating genetic resources, food security and cultural diversity. Earthscan, London.

Serratos, J.A. (2009) The origin and diversity of maize in the American continent. Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico, Mexico, p.36.

Shannon, C. E. (1948) A mathematical theory of communication. *AT&T Technical Journal* 27:379-423.

Shewayrga, H.; Sopade, P.A. (2011) Ethnobotany, diverse food uses, claimed health benefits and implications on conservation of barley landraces in North Eastern Ethiopia highlands. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **7:**19.

Silva, N.C.A.; Vidal, R.; Costa, F.M.; Vaio, M.; Ogliari, J.B.O. (2015) Presence of *Zea luxurians* populations (Durieu and Ascherson) Bird in southern Brazil: implications for the conservation of wild relatives of maize. *PloS ONE* 10(10): e0139034.

Silva, N.C.A.; Vidal, R.; Ogliari, J.B. (2017) New popcorn races in a diversity microcenter of *Zea mays* L. in the Far West of Santa Catarina, Southern Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution* 64**:** 1191-1204.

Terrazas, F.; Valdivia, G. (1998) Space dynamics of in situ preservation: handling of the genetic diversity of Andean tubers in mosaic systems. *Plant Genetic Resources Newsletter* 114:9-15.

Terrazas, F.; Guidi, A.; Cadima, X.; Gonzalez, R.; Chavez E.; Almanza, J.; Salazar, M.; Baudoin, J. P. (2005) Conservación in situ y valoración de las papas nativas en el microcentro de diversidad genetica de Candelaria, Cochabamba-Bolivia. *Agrociencia* 9:135-146.

van Heerwaarden, J.; Doebley, J.; Briggs, W.H.; Glaubitz, J.C.; Goodman, M.M. (2011) Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(3):1088-1092.

Vigouroux, Y.; Glaubitz, J.; Matsuoka, Y.; Goodman, M.M.; Sánchez, G.J.; Doebley, J.F. (2008) Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microstellites. *American Jornal of Botany* 95:1240-1253.

Wallace, K. (2007) Classification of ecosystem services: Problems and solutions. *Biological Conservation* 139:235-246.

Warburton, M. L.; Wilkes, G. H.; Taba, S.; Charcosset, A.; Mir, C.; Dumas, F.; et al. (2011) Gene flow among different teosinte taxa and into the domesticated maize

gene pool. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58:1243-1261.

Watling, J.; Shock, M.P.; Mongelo, G.Z.; Almeida, F.O.; Kater, T.; De Oliveira, P.E.; et al. (2018) Direct archaeological evidence for Southwestern Amazonia as an early plant domestication and food production centre. *PLoS ONE* 13(7): e0199868.

Zeven, A.C. (1998) Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica* 104:127-139.

Zimmerer, K. S. (1991) Managing diversity in potato and maize fields of the Peruvian Andes. *Journal of Ethnobiology*, 11:23–49.

Zimmerer, K. S.; Douches, D. S. (1991) Geographical approaches to crop conservation: the partitioning of genetic diversity in Andean potatoes. *Economic Botany* 45:176-189.

5. *ENTRELAÇADO*, UMA RAÇA DE MILHO RARA CONSERVADA NO SUDOESTE DA AMAZÔNIA

RESUMO

O milho é o principal cereal domesticado nas Américas e apresenta grande importância para a segurança alimentar global. Por muito tempo, a Amazônia representou um vazio nos mapas de cultivo da espécie, devido à falta de coletas e a ideia de que as raças localmente desenvolvidas foram extintas durante a colonização europeia. Um novo estudo colocou a Amazônia de volta no mapa com uma proposta de um centro de diversificação no Sudoeste da Amazônia. Nós prospectamos o milho nos estados brasileiros do Acre e Rondônia (Sudoeste da Amazônia brasileira) e encontramos variedades locais farináceas pertencentes à raça *Entrelaçado,* rara nas coleções existentes e frequentemente considerada extinta no campo. Coletamos nomes indígenas e locais, usos gerais e específicos para a *Entrelaçado,* e caracterizamos estes acessos em comparação com outros milhos brasileiros, especialmente farináceos, com base na literatura. Os milhos farináceos do Sudoeste formaram um grupo coerente na análise de agrupamento, que se agruparam com *Entrelaçado* da literatura, confirmando a sua identificação e demonstrando que esta raça está conservada no Sudoeste da Amazônia.

Palavras-chave: variedades locais, recursos genéticos, conservação, *Zea mays* spp. *mays.*

Entrelaçado, a rare maize race conserved in Southwestern Amazonia

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* spp. *mays* L.) is the major domesticated cereal of the Americas and is of great relevance for global food security. For a long time, Amazonia represented an empty space in the cultivation maps of this species, due to the lack of collections and the idea that locally developed races were extinct during European colonization. A new study placed Amazonia on the map again, with a proposal for a center of diversification in Southwestern Amazonia. We prospected maize in the Brazilian states of Acre and Rondônia (Southwestern Brazilian Amazonia) and found floury landraces belonging to the *Entrelaçado* race, rare in existing collections and often considered extinct in the field. We collected indigenous and local names, general and specific uses for *Entrelaçado*, and characterized these accessions to compare them with other Brazilian floury maize races, based on data from the literature. Floury maize from the Southwest formed a coherent group in the cluster analysis, which was grouped with *Entrelaçado* from the literature, confirming its identification and demonstrating that this race is conserved in Southwest Amazonia.

Keywords: landraces, genetic resources, conservation, *Zea mays* spp. *mays*.

5.1. Introdução

A subespécie *Zea mays* spp. *mays* L. foi domesticada no México (Doebley et al., 1990, 1997, 2006; Studer e Doebley, 2012) e diversificou durante sua distribuição para os extremos dos continentes americanos. Novas evidências levantaram hipóteses de que o processo de domesticação do milho foi mais complexo do que se parecia inicialmente (Vallebueno-Estrada et al., 2016; Ramos-Madrigal et al., 2016) e sugeriram que o milho chegou na Amazônia em estado parcial de domesticação (Kistler et al., 2018), onde sua diversificação continuou. No entanto, durante a conquista e colonização europeia, houve a extinção de muitos dos recursos genéticos da região (Clement, 1999), como poderia ser o caso das raças amazônicas de milho (Brieger et al., 1958), devido à dizimação das populações indígenas (Mann, 2005). Dados sobre o cultivo atual de variedades locais de milho e a presença de raças amazônicas não existem na literatura científica contemporânea.

O milho começou a ser domesticado no vale do rio Balsas, sudoeste do México, há pelo menos 9.000 anos antes do presente (AP) (Piperno et al., 2009). O milho chegou na América do Sul há pelo menos ~7.150 anos AP no Equador (Stothert, 1985; Pearsall e Piperno, 1990), ~6.700 anos AP no Peru (Grobman et al., 2012), ~6.500 anos AP nas terras baixas amazônicas da Bolívia (Brugger et al., 2016) e ~5.200 AP em Rondônia, Brasil (Hilbert et al., 2017). As terras baixas da América do Sul são consideradas um centro secundário de diversidade de raças de milho (Brieger et al., 1958, Paterniani e Goodman, 1977), onde diferentes povos indígenas consideraram o milho importante o suficiente para ter nomes que reconstroem até 4.400 anos AP (Brown et al., 2014).

As raças de milho se definem como grupos de populações aparentadas com suficientes características morfológicas em comum para permitir o seu reconhecimento como grupo (Anderson e Cutler, 1942), que ocupam uma região geográfica definida (Bird e Goodman, 1977), e que são associadas a usos específicos (Silva et al., 2016). Cerca de 300 raças foram descritas para o continente americano (Goodman e Brown, 1988), dentre as quais 40 % tem o endosperma farináceo, 30 % são duros, 20 % são dentados e 3 % possuem endosperma do tipo doce. No Brasil, a diversidade de raças foi inicialmente descrita por Cutler (1946), ampliada por Brieger et al. (1958), a partir de variedades locais coletadas, e complementada por Paterniani e Goodman (1977), por meio de variedades multiplicadas em campos experimentais. Para referência nesta pesquisa, o termo variedade local será utilizado referindo-se às variedades, portadoras de nomes iguais ou diferentes, manejadas e reproduzidas tradicionalmente por agricultores familiares, os quais envolvem comunidades tradicionais, ribeirinhas e indígenas. A classificação de raças do Brasil proposta por Paterniani e Goodman (1977) identificou 15 raças e 19 sub-raças de milho, dentro das quais apenas quatro 'raças indígenas' (*Entrelaçado, Caingang, Moroti* e *Lenha*) apresentam endosperma farináceo. As sub-raças tem variantes em apenas uma característica da raça, tal como a cor do endosperma (Brieger et al., 1958). Além disso, o milho farináceo apresenta maior teor de aminoácidos e até 60% a mais de lisina do que os outros tipos de milho (Mertz et al., 1964). A raça *Entrelaçado*, portanto, é uma fonte de alimento com alto valor nutricional para humanos e animais, e possui potencial para programas de melhoramento visando aumentar a qualidade das proteínas das cultivares e para o mercado de farinha.

A *Entrelaçado* é típica da Amazônia, com seis sub-raças (*Ticuna, Acre, Reyes, Bororó, Tapirapé* e *Chavantes*), mas, devido à raridade das coletas, uma caracterização completa não foi realizada (Brieger

et al., 1958). Segundo Grobman et al. (1961), esta raça tem potencial para ser a mais amplamente distribuída, mas as coletas na Amazônia foram escassas (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977). O nome *Entrelaçado* foi empregado devido ao arranjo de fileiras irregular e entrelaçado dos grãos de milho (Figura 1), principal característica da raça. O caráter do entrelaçamento das espigas é limitado geograficamente à Amazônia e foi mencionado como um caráter ancestral, que se originou no Sudoeste da Amazônia e se dispersou até a Amazônia Oriental (Brieger et al., 1958). Em outras partes da América do Sul, a raça é denominada de *Piricinco* no Peru, *Pojoso* (Grobman et al., 1961) e *Coroico* (Cutler, 1946; Ramírez et al., 1960) na Bolívia. Brieger et al. (1958) e Paterniani e Goodman (1977) classificaram a raça *Entrelaçado* com base em 33 e 11 amostras, respectivamente, a maioria das quais não existe mais. Brieger et al. (1958) apresentaram uma proposta para a distribuição geográfica da raça e suas sub-raças na Bacia Amazônica, a qual relacionamos à distribuição das famílias linguísticas indígenas, demonstrando que muitos povos indígenas do Oeste, Sudoeste e Sul usavam essa raça (Figura 2). Brown et al. (2014) reconstruíram termos para milho entre os povos das línguas Pano e Tupi até 2000 anos atrás, mas não para as línguas Ticuna, por falta de dados.

Figura 1. O nome *Entrelaçado* foi empregado devido ao arranjo de fileiras irregular e entrelaçado dos grãos de milho. Registro fotográfico de uma espiga da raça *Entrelaçado* realizado durante a expedição de coleta em Guajará-Mirim, Rondônia. Fotografia: Flaviane Malaquias Costa.

Brieger et al. (1958) lamentaram a amostragem reduzida do milho na Amazônia por suspeitar que, nesta área, poderia haver raças antigas que ainda eram conservadas por povos indígenas, mas possivelmente já foram extintas. A raça *Entrelaçado* foi a única descrita para a Amazônia brasileira (Paterniani e Goodman, 1977) e sua presença é rara nas coleções existentes. A coleção de milho do Brasil apresenta 4079 acessos conservados no Banco de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (plataforma Alelo: https://www.embrapa.br/en/alelo), duplicado no CIMMYT. Esta coleção conserva 38 acessos nomeadas como *Entrelaçado*, embora frequentemente há dúvidas nos dados de passaporte sobre a sua identidade, uma vez que a Embrapa apresenta dados de passaporte incompletos e não realizou a classificação por meio de descritores morfológicos e análises estatísticas. Este

número de acessos (38) representa apenas 0,9 % das variedades de milho conservadas na coleção e a maioria não foi renovada recentemente. A última vez que uma equipe da Embrapa coletou uma variedade chamada de *Entrelaçado* foi em 1980, nos municípios Tarauacá (Acre, Brasil), Guarajá-Mirim (Rondônia, Brasil) e Cobija (Pando, Bolívia) (plataforma Alelo: https://www.embrapa.br/en/alelo), próximos de onde nós coletamos. Com o intuito de resgatar a história perdida do milho da Amazônia, o objetivo do nosso estudo foi prospectar e caracterizar variedades locais e identificar as raças de milho farináceo atualmente conservadas *on farm* na região.

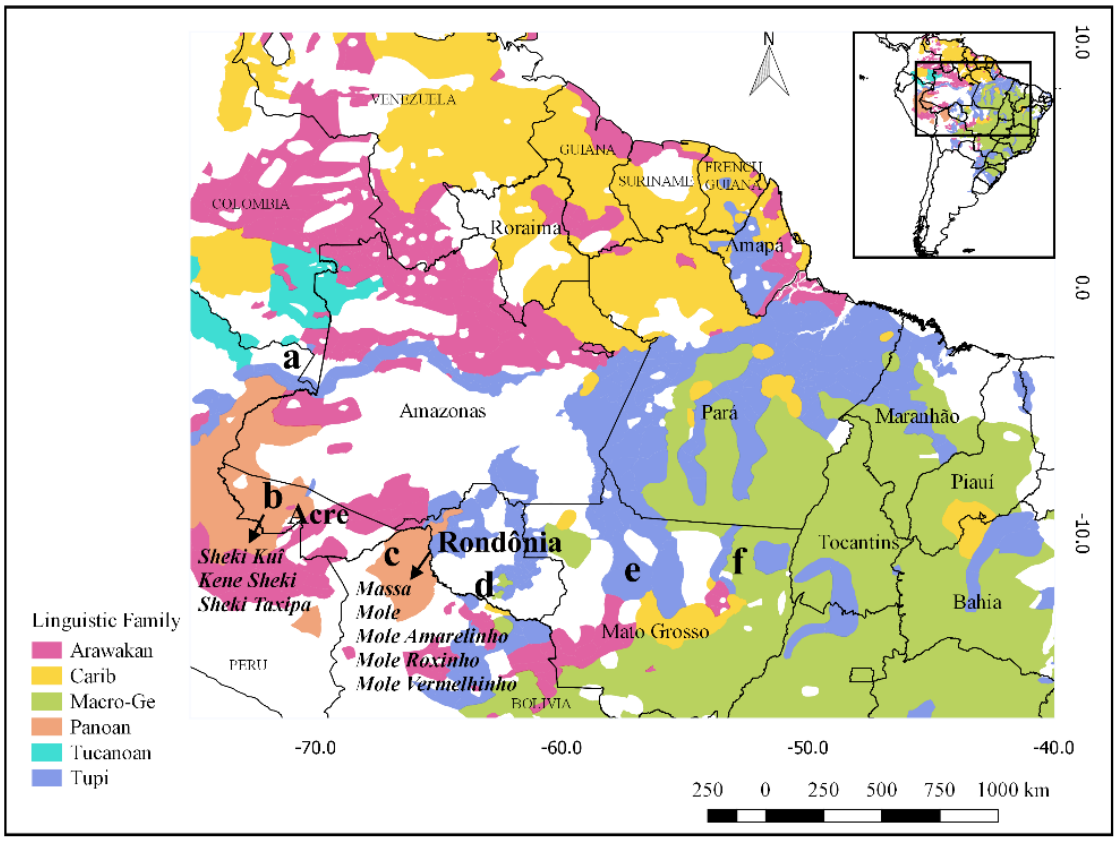

Figura 2. Distribuição geográfica das famílias linguísticas indígenas da Amazônia (Eriksen, 2011) e da raça *Entrelaçado* e suas sub-raças na Bacia Amazônica: a) *Ticuna*; b) *Acre*; c) *Reyes*; d) *Bororó*; e) *Tapirape*; f) *Chavantes*. A localização das letras foi baseada no modelo proposto por Brieger et al. (1958). As coletas da pesquisa foram realizadas no Acre e Rondônia (destacados) e as setas indicam nomes locais e indígenas identificados para a raça *Entrelaçado* por meio do levantamento etnobotânico. O mapa foi elaborado por meio do software QGIS (http://qgisbrasil.org).

5.2. Material e Métodos

A pesquisa foi realizada pelo Laboratório de Genética Ecológica de Plantas da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo (Brasil) e Laboratório de Fitotecnia y Recursos Fitogenéticos da Universidad de la Republica (Uruguai), e contou com a colaboração da Rede de Pesquisa Colaborativa do Grupo Interdisciplinar de Estudos em Agrobiodiversidade (InterABio). As coletas de campo contemplaram cinco biomas (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa) e seis regiões (Acre, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraiba, Rio Grande do Sul, Rondônia). Em cada região foram conduzidos estudos etnobotânicos e caracterização fenotípica das variedades locais de milho cultivadas por agricultores locais, realizados no período de maio de 2017 a abril de 2019. Este estudo foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da ESALQ/USP, pelo CONEP, processo CAAE 60382016.2.0000.5395, e foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (cadastro nº AD2EF0B).

O estudo aqui apresentado teve como foco a Amazônia, nos estados de Rondônia (RO) e Acre (AC), e contou com a participação de 20 respondentes para a caracterização etnobotânica, sendo: (i) 12 agroextrativistas mestiços descendentes de indígenas e migrantes brasileiros, residentes na Reserva Extrativista do Rio Ouro Preto (RESEX ROP), no município de Guajará-Mirim, Rondônia; e (ii) oito indígenas da Associação do Movimento dos Agentes Agroflorestais Indígenas (AMAAIAC) dos municípios de Jordão, Tarauacá e Feijó, no estado do Acre. Para a caracterização fenotípica visando à identificação de raças de milho, foram considerados os dados de cinco variedades locais de milho farináceo coletadas pela equipe na região da Amazônia, oriundas do RO e AC.

5.2.1. Caracterização etnobotânica

A caracterização etnobotânica foi realizada por meio de duas estratégias: entrevistas (em RO) e lista de variedades (no AC). As entrevistas foram realizadas individualmente com 12 agroextrativistas do estado de RO, com o auxílio de um questionário semi-estruturado, composto por perguntas sobre as variedades locais de milho, como: nome local, origem, tempo de cultivo, usos e registros associados ao cultivo e à história do milho na região. A lista de variedades foi elaborada pelos indígenas do AC durante a oficina “Raças de Milho” realizada na Comissão Pró-Índio (CPI), a qual continha o nome da(s) variedade(s) em português e na língua indígena, origem (endógena ou exógena), seus respectivos usos associados, bem como a identificação do respondente. Essa atividade também foi elaborada de forma individual, totalizando um conjunto de oito listas. Os nomes das variedades identificados foram atribuídos por indígenas da etnia *Kaxinawá*, pertencentes ao tronco linguístico Pano, das terras indígenas: *Kaxinawá* do Seringal Curralinho (Feijó, AC), *Kaxinawá* do Rio Jordão (Jordão, AC), *Kaxinawá* da Praia do Carapanã (Tarauacá, AC), *Kaxinawá* Seringal Independência (Jordão, AC) e *Katukina/Kaxinawá* (Feijó, AC).

As variedades locais de milho podem ser utilizadas pelos agricultores para finalidades distintas. Por isso, foram estimadas as frequências das variedades identificadas, separadamente, em cada categoria a seguir: alimentação da família, alimentação animal, venda e artesanato (Tabela 1). Os dados da caracterização etnobotânica foram analisados por meio de estatística descritiva.

5.2.2. Caracterização fenotípica das variedades locais de milho farináceo visando a identificação de raças

A caracterização fenotípica deste estudo foi realizada exclusivamente para as variedades locais de milho farináceo coletadas na Amazônia brasileira, considerando que as raças descritas para a região possuíam este tipo de endosperma. Juntamente com as raças de milho pipoca, os milhos farináceos foram classificados como *Indígenas*, e se diferenciam das demais raças das terras baixas da América do Sul por serem geneticamente mais próximas ao milho cultivado na época pré-colombiana (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1997).

No âmbito do projeto que contemplou seis regiões do Brasil, foram coletadas 203 amostras de variedades locais de milho, dentro das quais 14 amostras (6 %) apresentaram endosperma do tipo farináceo e cinco (2,5 %) foram coletadas na Amazônia, sendo uma oriunda do estado do Acre (ACF3A) e quatro do estado de Rondônia (ROF1B, ROF1C, ROF11A, ROF10A). Esta frequência demonstra o quão raras são as variedades de milho farináceo atualmente.

A caracterização fenotípica foi realizada por meio de 17 descritores morfológicos considerados chaves para a classificação de raças de milho (Bird e Goodman, 1977; Silva et al., 2016). Os descritores são: i) para a espiga [cor do grão na coroa, forma da espiga, arranjo de grãos nas fileiras, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira, comprimento da espiga (cm), diâmetro da espiga (cm), cor do sabugo, diâmetro do sabugo (cm) e diâmetro da ráquis (cm)], e ii) para o grão [tipo de endosperma (grão), comprimento do grão (mm), largura do grão (mm), espessura do grão (mm), forma da superfície do grão, cor do pericarpo e cor do endosperma]. Para cada variedade foram caracterizadas o número de espigas doadas pelo(a) agricultor(a), conforme a disponibilidade na ocasião da coleta. Para as variáveis qualitativas foram obtidas as frequências absolutas de cada variação/categoria dentro da característica e o valor de maior frequência (moda) foi adotado para caracterizar a variedade para aquela variável. Para as variáveis quantitativas foram obtidas as médias aritméticas.

A análise dos dados foi realizada por meio da análise de agrupamento, com objetivo de classificar as variedades locais amazônicas referente à sua apropriada raça de milho. A análise considerou as cinco variedades locais de milho coletadas na Amazônia e os dados disponíveis na literatura para as raças de milho farináceo descritas para o Brasil, incluindo as raças indígenas *Caingang*, *Entrelaçado*, *Lenha* e *Moroti* (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977). A distância genética foi estimada mediante o índice de similaridade genética de Gower (1971), o qual combina variáveis qualitativas e quantitativas. E foi utilizado método aglomerativo de Ward. Esta análise teve como objetivo validar a presença de grupos e classificar as raças atualmente conservadas *in situ-on farm* na região. As análises multivariadas foram realizadas por meio do *software* R, pacotes Vegan (Oksanen et al., 2016) e Cluster (Maechler et al., 2015).

Foram coletadas e caracterizadas variedades que os agricultores tinham disponíveis para doar e que apresentavam “espigas” não debulhadas, uma vez que a classificação da raça requer caracterização de descritores chaves da espiga. Por este motivo, o número de variedades identificadas pelo estudo etnobotânico foi superior ao número de variedades coletadas e caracterizadas.

5.3. Resultados e discussão

As 61 variedades identificadas no levantamento etnobotânico na Amazônia (32 em RO e 29 no Acre) receberam 37 nomes locais e indígenas (Anexo F). Foram identificadas 19 (31 %) variedades locais para a raça *Entrelaçado,* com cinco nomes locais e três nomes indígenas, os quais se associaram às características morfológicas, como cor, tamanho e tipo do endosperma: i) nomes locais: *Massa* (3 variedades), *Mole* (5), *Mole Amarelinho* (1), *Mole Roxinho* (1), *Mole Vermelhinho* (1); ii) nomes indígenas/nomes traduzidos em português pelos indígenas: *Sheki Kuî*/ *Milho Massa* (4), *Kene Sheki*/*Milho Massa de várias cores* (1) e *Sheki Taxipa*/*Milho Massa Vermelho* (1)*;* sem nome indígena (2)/*Milho Massa*. Os participantes indígenas pertencem às etnias Katukina e Kaxinawá (autodenominação *Huni Kuin*), da

família linguística Pano. Nenhum nome indígena para esta raça foi citado anteriormente por Brieger et al. (1958) ou Paterniani e Goodman (1977).

Os agricultores relataram que as variedades locais foram cultivadas por familiares na região há mais de 100 anos, que corresponde ao primeiro ciclo da borracha (1870-1912) (Lacerda, 2006). O diagnóstico demonstrou que 79 % das 19 variedades da raça *Entrelaçado* são nativas da própria região (obtidas por meio de herança de família, origem indígena, vizinhos e trocas), e 21 % são de origem exógena, sendo introduzidas da Bolívia, região fronteiriça (Anexo F). Estes resultados demonstram que existe uma relação histórica e cultural do milho com os humanos que habitaram a região e que é continuada pelos que habitam no presente. Dentro deste contexto, que congrega diferentes usos das variedades e aspectos culturais da alimentação local (Tabela 1), foram identificados 28 usos culinários típicos do milho na alimentação humana, incluindo os seguintes usos tradicionais e indígenas indicados especificamente para o milho *Entrelaçado*. Além dos usos tradicionais e indígenas atuais, foi relatado, pelos ribeirinhos, o uso histórico do "*pão de índio*" que era fabricado pelos indígenas. Segundo os agricultores, este alimento consiste em uma fonte rica de carboidrato, preparado a partir de uma massa feita com farinha de mandioca e de milho *Massa* ou *Mole* da raça *Entrelaçado*. Essa massa é queimada por fora, envolta por folha de bananeira e enterrada, o que permite a conservação por muitos anos. Os entrevistados informaram que ao encontrar o "*pão de índio*" ainda o utilizam como alimento.

Figura 3. Usos locais e indígenas das variedades locais de milho identificados por meio do levantamento etnobotânico nos estados do Acre e Rondônia, Brasil.

Uso das variedades locais de milho	N°	%
Alimentação humana*	40	52,63
Alimentação animal	26	34,21
Venda	5	6,58
Artesanato	5	6,58
Total	76	100

*Riqueza de usos culinários típicos do milho: biscoitinho doce assado, biscoito, bodó frito (bolinho), bolo, broa doce, canjica, chicha (bebida fermentada de origem indígena), creme de milho, curau (mingau), cuscuz (preparado com sêmolas – moagem incompleta – do grão milho), farinha, doce (com o fubá), milho assado na palha ou sem palha, milho assado na fogueira com mel, milho com carne, milho torrado, milho verde, mingau, munguzá (chá de burro) feito com leite de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), paçoca (milho torrado socado no pilão com açúcar), pamonha (iguaria preparada com milho verde triturado, temperado com açúcar ou sal, depois cozido e enrolado na palha do milho ou na folha de bananeira), pão, carne de pato, galinha ou de boi moída com milho, pipoca, polenta, prato preparado com milho ralado com pequi (*Cayocar villosum*) na galinha caipira, rosquinha e sopa.

A análise dos dados fenotípicos foi realizada por meio da análise de agrupamento, com o objetivo de identificar a estrutura populacional e classificar a raça de milho referente às variedades caracterizadas. Foram incluídos dados disponíveis na literatura para as raças de milho farináceo descritas para o Brasil, incluindo as raças indígenas *Caingang*, *Entrelaçado*, *Lenha* e *Moroti* (Brieger et al., 1958; Paterniani e Goodman, 1977). A análise apresentou a formação de um grupo coerente composto pelas variedades do Sudoeste da Amazônia, do Acre (AC) e de Rondônia (RO), que se agruparam à raça *Entrelaçado* (Figura 3). A variedade ROF10A, cultivada por um agricultor com ascendência indígena em Rondônia, apresentou-se mais próxima da raça *Entrelaçado* da literatura, e as variedades ACF3A, ROF11A, ROF1B e ROF1A apresentaram-se mais próximas entre si. Este grupo de milhos amazônicos apresentou-se isolado das outras

raças de milho farináceo, o que descartou a possibilidade de pertencer a estas raças. A análise permitiu classificar as variedades caracterizadas como raça *Entrelaçado*.

A identificação da raça *Entrelaçado* confirmou a existência continuada dessa raça amazônica desde a época pré-conquista (Brieger et al., 1958) até os dias atuais no Sudoeste da Amazônia, região indicada como centro de diversificação do milho, e confirma que a raça não foi extinta. A raça continua sendo conservada por agricultores tradicionais e povos indígenas que habitam a região, que atribuem nomes locais e indígenas à esta raça, e possuem usos culinários típicos. Acreditamos que é provável que outras comunidades tradicionais e povos indígenas na Amazônia também mantenham variedades da raça *Entrelaçado*. Mediante as evidências recentes que apontam a importância do Sudoeste da Amazônia no processo evolutivo da espécie (Kistler et al., 2018), a presente pesquisa ressalta a importância da conservação do milho da Amazônia, a qual congrega uma das raças mais antigas da América do Sul ainda sob cultivo.

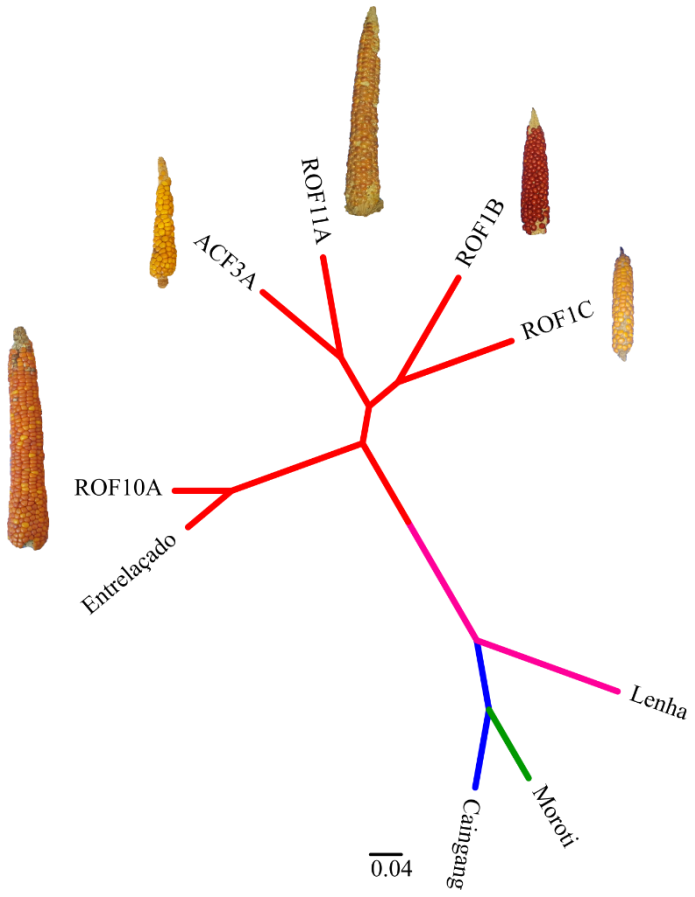

Figura 4. Análise de agrupamento de Ward, com base no Índice de Gower, das características morfométricas das variedades locais caracterizadas para este estudo - AC (Acre) F3A, RO (Rondônia) F1B, F1C, F11A, F10A - e das raças de milho farináceo do Brasil descritas na literatura científica para as terras baixas da América do Sul (Paterniani e Goodman, 1977).

REFERÊNCIAS

Anderson, E. & Cutler, H. Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. *Ann. Mo. Bot. Gard.* ***29,*** 69-89 (1942).

Bird, R. M. & Goodman, M. M. The races of maize V: grouping maize races on the basis of ear morphology. *Econ. Bot*. ***31,*** 471-481 (1977).

Brieger, F. G., Gurgel, J. T. A., Paterniani, E., Blumenschein, A. & Alleoni, M. R. *Races Of Maize In Brazil And Other Eastern South American Countries* (National Academy of Sciences, Washington, DC, 1958).

Cutler, H. C. Races of maize in South America. *Bot. Mus. Leafl*. ***12,*** 257-299 (1946).

Brown, C. H., Clement, C. R., Epps, P., Luedeling, E. & Wichmann, S. The paleobiolinguistics of maize (*Zea mays* L.). *Ethnobiology Letters.* ***5,*** 52-64 (2014).

Brugger, S. O. et al. Longterm man-environment interactions in the Bolivian Amazon: 8000 years of vegetation dynamics. *Quat Sci Rev.* ***132,*** 114–28 (2016).

Clement, C. R. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources.I. The relation between domestication and human population decline. *Econ. Bot.* ***53,*** 188-202 (1999).

Doebley, J. F., Stec, A., Wendel, J. & Edwards, M. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: Implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87,** 9888–9892 (1990).

Doebley, J. F., Stec, A. & Hubbard, L. The evolution of apical dominance in maize. *Nature*. **386,** 485–488 (1997).

Doebley, J. F., Gaut, B. S. & Smith, B. D. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*. **127,** 1309–1321 (2006).

Eriksen, L. Nature and culture in prehistoric Amazonia: using GIS to reconstruct ancient ethnogenetic processes from archaeology, linguistics, geography, and ethnohistory, thesis, Lund University, Lund, Sweden (2011).

Goodman, M. M. & Brown, W. “Races of corn” in *Corn And Corn Improvement* (American Society of Agronomy - Crop Science Society of America - Soil Science Society of America, Madison, ed. 3, 1988), pp. 37-79.

Gower, J. C. A. General coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*. ***27,*** 857-871 (1971).

Grobman, A., Salhauana, W. & Sevilla, R. *Races Of Maize In Peru: Their Origins, Evolution And Classification* (National Academy of Sciences, Washington, DC, 1961).

Grobman, A. et. al. Preceramic maize from Paredones and Huaca Prieta, Peru. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109,** 1755–1759 (2012).

Hilbert, L. et al. Evidence for mid-Holocene rice domestication in the Americas. *Nat. Ecol. Evol.* ***1,*** 1693-1698 (2017).

Kistler, L. et al. Multiproxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. *Science* **362,** 1309–1313 (2018).

Vallebueno-Estrada, M. et al. The earliest maize from San Marcos Tehuacán is a partial domesticate with genomic evidence of inbreeding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113,** 14151–14156 (2016).

Lacerda, F. G. Migrantes cearenses no Pará: faces da sobrevivência (1889-1916), thesis, University of São Paulo, São Paulo, Brazil (2006).

Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M. & Hornik, K. Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.0.1 (2015).

Mann, C. C. *1491: New Revelations Of The Americas Before Columbus* (Alfred a Knopf, New York, NY, 2005).

Mertz, E. T., Bates, L. S. & Nelson, O. E. Mutant that changes protein composition and increases lysine content of maize endopserm. *Science* **45,** 279-280 (1964).

Paterniani, E. & Goodman, M. M. *Races Of Maize In Brazil And Adjacent Areas* (International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, DF, 1977).

Pearsall, D. M. & Piperno, D. R. Antiquity of maize cultivation in Ecuador: summary and reevaluation of the evidence source. *Am. Antiq.* **55,** 324-337 (1990).

Piperno, D. R., Ranere, A. J., Holst, I., Iriarte, J. & Dickau, R. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **106,** 5019-5024 (2009).

Ramírez, R. E. et al. *Races Of Maize In Bolivia* (National Academy of Sciences, Washington, DC, 1960).

Ramos-Madrigal, J. et al. Genome sequence of a 5,310-year-old maize cob provides insights into the early stages of maize domestication. *Curr. Biol.* **26,** 3195–3201 (2016).

R Core Team, R: A language and environment for statistical computing (2015).

Oksanen, J. et al. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3.5 (2016).

Silva, N. C. A., Vidal, R., Ogliari, J. B. New Pipoca races in a diversity microcenter of *Zea mays* L. in the Far West of Santa Catarina, Southern Brazil. *Genet Resour Crop Evol*. **64,** 1191-1204 (2016).

Stothert, K. E. The preceramic Las Vegas culture of Coastal Ecuador. *Am. Antiq.* **50,** 613-637 (1985).

6. CONCLUSÕES

A pesquisa ampliou o conhecimento sobre a história evolutiva do milho nas terras baixas da América do Sul, envolvendo uma amostragem mais ampla. O entendimento da história de dispersão do milho é relevante uma vez que pode permitir a identificação de áreas com concentração de variabilidade genética que poderão orientar futuras prospecções e esforços de conservação dos recursos genéticos do milho, tanto *in situ-on farm* como *ex situ*, e que também poderão ser utilizados para o melhoramento genético da espécie. As hipóteses de dispersão do milho nas terras baixas da América do Sul foram discutidas e foram sugeridos dois potenciais centros de diversificação do milho (Sudoeste da Amazônia e as região do Pampa do Brasil e Uruguai). O estudo também identificou micro-centros de diversidade, com base em indicadores e índices etnobotânicos, fenotípicos e moleculares de diversidade genética do milho na região. Baseado nos resultados obtidos, todas as regiões envolvidas na presente pesquisa foram consideradas micro-centros de diversidade do milho, tais como: Divino, Minas Gerais; Esperança, Paraíba; Ibarama, Rio Grande do Sul; Juti, Mato Grosso do Sul; Guajará-Mirim, Rondônia (no Brasil); e La Paloma, Rocha; Tacuarembó, Tacuarembó; Tala, Canelones (no Uruguai). Por encontrarem-se em zonas vulneráveis à erosão genética, estas regiões também são sugeridas como *hotspots* de agrobiodiversidade, os quais são considerados zonas prioritárias de conservação dos recursos genéticos da espécie. A pesquisa ainda constatou a presença da raça amazônica *Entrelaçado*, rara nas coleções existentes e frequentemente considerada extinta no campo, no Sudoeste da Amazônia, sendo conservada por agricultores tradicionais e povos indígenas que habitam a região. Com base em critérios analíticos, as informações geradas pela pesquisa atribuem respaldo e reconhecimento cientifico à diversidade genética do milho diagnosticada nestas áreas e podem subsidiar políticas públicas e programas de conservação dos recursos genéticos do milho nas terras baixas da América do Sul.

Anexos

ANEXO A. Nomes locais das variedades de milho identificadas por meio da caracterização etnobotânica no Brasil.

Nomes Locais	N°	%	Nomes Locais	N°	%	Nomes Locais	N°	%
Jabatão	19	6,4	Paraná	2	0,7	Mar de Espanha	1	0,3
Branco	16	5,4	Pipoca Branca	2	0,7	Maranhão	1	0,3
Palha Roxa	12	4,1	Pipoca Preta	2	0,7	Mato Grosso	1	0,3
Asteca	11	3,7	Pixurum 05	2	0,7	Medalhão do Padre Cícero	1	0,3
Pontinha	11	3,7	Saboró Amarelo	2	0,7	Milhão	1	0,3
Bico de Ouro	9	3	Sabugo Grosso	2	0,7	Milho da Safra	1	0,3
Crioulo	8	2,7	Serra Baixa	2	0,7	Milho de Adelaide	1	0,3
Alho	7	2,4	Maisena	2	0,7	Milho de Angola	1	0,3
Pipoca	7	2,4	Alho Grande	1	0,3	Milho de Carro	1	0,3
Cinquentinha	6	2	Alho Pequeno	1	0,3	Milho do Paiol	1	0,3
Lombo Baio	6	2	Amarelo	1	0,3	Milho do Paiol com Fortalez	1	0,3
Amarelão	5	1,7	Asteca Amarelo	1	0,3	Milho para Pamonha	1	0,3
Comum	5	1,7	Asteca Branco	1	0,3	Mole Amarelinho	1	0,3
Jabatão Vermelho	5	1,7	Asteca Palha Roxa	1	0,3	Mole Roxinho	1	0,3
Mole	5	1,7	Avermelhado	1	0,3	Mole Vermelhinho	1	0,3
Preto	5	1,7	Branco de Canjica	1	0,3	Oito Carreiras	1	0,3
Caiano de Sobrália	4	1,4	Cabo Roxo	1	0,3	Oito Carreiras Branco	1	0,3
Cubano	4	1,4	Caiano Amarelo	1	0,3	Palha de Seda	1	0,3
Gabão	4	1,4	Cana Roxa	1	0,3	Palha Fina	1	0,3
Macabu	4	1,4	Cateto Branco	1	0,3	Palha Roxa e Branca	1	0,3
Pixurum	4	1,4	Cateto Pintado	1	0,3	Pedra Dourada	1	0,3
Roxo	4	1,4	Catingueiro	1	0,3	Pintadinho	1	0,3
Vermelho	4	1,4	Crioulo Roxo	1	0,3	Pipoca Alho	1	0,3
Brancão	3	1	Cunha	1	0,3	Pipoca Amarela	2	0,7
Duro	3	1	Cunha Vermelho	1	0,3	Pipoca Cinza	1	0,3
Macabu com Palha Roxa	3	1	Dente de Burro	1	0,3	Pipoca Colorida	1	0,3
Massa	3	1	Dente de Cavalo com Palha Roxa	1	0,3	Pipoca Roxa	1	0,3
Pintado	3	1	Dente de Ouro Roxo	1	0,3	Pipoca Vermelha	1	0,3
Saboró Branco	3	1	Dente do Ouro	1	0,3	Pururuca	1	0,3
Sabuguinho	3	1	Doce	1	0,3	Rabo de Caxixi	1	0,3
Sabuguinho Fino	3	1	Encapadinho	1	0,3	Roxinho	1	0,3
Caiano	2	0,7	Goiano	1	0,3	Saboró Roxo	1	0,3
Cateto Amarelo	2	0,7	Jabatão Branco	1	0,3	Sabugo Fino	1	0,3
Colorido	2	0,7	Jabatão Sabugo Branco	1	0,3	Sempre Verde	1	0,3
Cravo	2	0,7	Jabatão Sabugo Vermelho	1	0,3	Sertanejo	1	0,3
Cunha Amarelo	2	0,7	Jequiri	1	0,3	Sete Semanas	1	0,3
Dente de Cavalo	2	0,7	Kuli	1	0,3	Sol da Manhã	1	0,3

ANEXO A. (continuação) Nomes locais das variedades de milho identificadas por meio da caracterização etnobotânica no Brasil.

Nomes Locais	N°	%	Nomes Locais	N°	%	Nomes Locais	N°	%
Ferro	2	0,7	Macabu Sabugo Branco	1	0,3	Tunicado	1	0,3
Milho da Produção	2	0,7	Macabu Sabugo Roxo	1	0,3	Variedade	1	0,3
Oito Carreiras Amarelo	2	0,7	Macabuzinho	1	0,3	Vermelhão	1	0,3
Total							**296**	**100**

ANEXO B. Nomes locais das variedades de milho identificadas por meio da caracterização etnobotânica no Uruguai.

Nomes Locais	N°	%	Nomes Locais	N°	%
Criollo	9	11,7	Boldo	1	1,3
Blanco	9	11,7	Cateto	1	1,3
Catete	7	9,1	Cateto Amarillo	1	1,3
Colorado	5	6,5	Criollo Amarillo Dulce	1	1,3
Diente de Caballo	3	3,9	Criollo Blanco	1	1,3
Catete Blanco	3	3,9	Cuarentino Dulce	1	1,3
Común	3	3,9	Dulce Blanco	1	1,3
Amarillo	2	2,6	Duro	1	1,3
Arco Iris	2	2,6	Forrajera Amarillo	1	1,3
Colorado Criollo	2	2,6	Forrajera Blanca	1	1,3
Cuarentino	2	2,6	Maíz	1	1,3
Dulce	1	1,3	Morocho	1	1,3
Negro	2	2,6	Naranja	1	1,3
Palha Roxa	2	2,6	Picoca	1	1,3
Pisingallo	1	1,3	Pisingallo Blanco y Colorado	1	1,3
Anaranjado Forrajero	1	1,3	Pisingallo Blanco y Dorado	1	1,3
Angélica	1	1,3	Pisingallo Colorado	1	1,3
Bagual	1	1,3	Pisingallo Rojo	1	1,3
Blanco Dulce	1	1,3	Sangre de Toro	1	1,3
Blanco Forrajero	1	1,3			
Total				**77**	**100**

ANEXO C. Nomes locais das variedades de milho em comum identificados em diferentes regiões das terras baixas da América do Sul.

Nome local	Região	N°	Nome local	Região	N°
Alho	Minas Gerais	4	Pipoca	Mato Grosso do Sul	2
	Paraíba	2		Minas Gerais	3
	Rondônia	1		Rondônia	2
Amarillo	Rocha/Treinta y Tres	1	Cuarentino	Rocha/Treinta y Tres	1
	Canelones	1		Tacuarembó/Rivera	1
Asteca	Mato Grosso do Sul	9	Duro	Rondônia	3
	Minas Gerais	2		Rocha/Treinta y Tres	1
Blanco	Rocha/Treinta y Tres	4	Maisena	Mato Grosso do Sul	1
	Canelones	5		Minas Gerais	1
Preto	Mato Grosso do Sul	1	Roxo	Mato Grosso do Sul	1
	Minas Gerais	2		Minas Gerais	2
	Paraíba	2		Paraíba	1
Caiano	Minas Gerais	1	Pipoca Amarela	Minas Gerais	1
	Rio Grande do Sul	1		Rio Grande do Sul	1
Catete	Rocha/Treinta y Tres	1	Pipoca Branca	Minas Gerais	1
	Tacuarembó/Rivera	6		Rio Grande do Sul	1
Colorado	Rocha/Treinta y Tres	3	Colorido	Minas Gerais	1
	Tacuarembó/Rivera	2		Rio Grande do Sul	1
Comum	Mato Grosso do Sul	1	Palha Roxa	Minas Gerais	9
	Minas Gerais	1		Rio Grande do Sul	3
	Rondônia	3		Tacuarembó/Rivera	2
Diente de Caballo	Rocha/Treinta y Tres	2	Común	Tacuarembó/Rivera	2
	Tacuarembó/Rivera	1		Canelones	1
Criollo	Rocha/Treinta y Tres	3	Branco	Mato Grosso do Sul	3
	Tacuarembó/Rivera	4		Minas Gerais	11
	Canelones	2		Paraíba	1
Vermelho	Mato Grosso do Sul	1		Rondônia	1
	Minas Gerais	2			
	Rio Grande do Sul	1			
Total					127

ANEXO D. Nomes locais exclusivos das variedades de milho identificados em diferentes regiões das terras baixas da América do Sul.

Região	Nome local	N°
Mato Grosso do Sul (14)	Asteca Amarelo	1
	Asteca Branco	1
	Asteca Palha Roxa	1
	Pipoca Alho	1
	Pipoca Cinza	1
	Pipoca Vermelha	1
	Pixurum	4
	Pixurum 05	2
	Saboró Amarelo	2
	Saboró Branco	3
	Saboró Roxo	1
	Sempre Verde	1
	Sol da Manhã	1
	Variedade	1
Minas Gerais (33)	Alho Grande	1
	Alho Pequeno	1
	Amarelo	1
	Branco de Canjica	1
	Caiano de Sobrália	4
	Cana Roxa	1
	Cravo	2
	Crioulo	8
	Crioulo Roxo	1
	Dente de Burro	1
	Dente de Cavalo	2
	Dente de Cavalo com Palha Roxa	1
	Encapadinho	1
	Jequiri	1
	Macabu	4
	Macabu com Palha Roxa	3
	Macabu Sabugo Branco	1
	Macabu Sabugo Roxo	1
	Macabuzinho	1
	Mar de Espanha	1
	Milhão	1
	Milho de Carro	1
	Milho do Paiol	1
	Milho do Paiol com Fortalez	1

ANEXO D. (continuação) Nomes locais exclusivos das variedades de milho identificados em diferentes regiões das terras baixas da América do Sul.

Região	Nome local	N°
Minas Gerais (33)	Palha Roxa e Branca	1
	Paraná	2
	Pedra Dourada	1
	Pintadinho	1
	Pipoca Colorida	1
	Pipoca Preta	2
	Rabo de Caxixi	1
	Roxinho	1
	Serra Baixa	2
Paraíba (13)	Gabão	4
	Goiano	1
	Jabatão	19
	Jabatão Branco	1
	Jabatão Sabugo Branco	1
	Jabatão Sabugo Vermelho	1
	Jabatão Vermelho	5
	Maranhão	1
	Medalhão do Padre Cícero	1
	Milho de Adelaide	1
	Pontinha	11
	Sabugo Fino	1
	Sabugo Grosso	2
Rio Grande do Sul (33)	Amarelão	5
	Bico de Ouro	9
	Brancão	3
	Cabo Roxo	1
	Caiano Amarelo	1
	Cateto Amarelo	2
	Cateto Branco	1
	Cateto Pintado	1
	Catingueiro	1
	Cinquentinha	6
	Cunha	1
	Cunha Amarelo	2
	Cunha Vermelho	1
	Dente de Ouro Roxo	1
	Dente do Ouro	1

ANEXO D. (continuação). Nomes locais exclusivos das variedades de milho identificados em diferentes regiões das terras baixas da América do Sul.

Região	Nome local	N°
Rio Grande do Sul (33)	Doce	1
	Ferro	2
	Kuli	1
	Lombo Baio	6
	Mato Grosso	1
	Oito Carreiras	1
	Oito Carreiras Amarelo	2
	Oito Carreiras Branco	1
	Palha de Seda	1
	Palha Fina	1
	Pintado	3
	Pipoca Roxa	1
	Pururuca	1
	Sabuguinho	3
	Sabuguinho Fino	3
	Sertanejo	1
	Tunicado	1
	Vermelhão	1
Rondônia (12)	Avermelhado	1
	Cubano	4
	Massa	3
	Milho da Produção	2
	Milho da Safra	1
	Milho de Angola	1
	Milho para Pamonha	1
	Mole	5
	Mole Amarelinho	1
	Mole Roxinho	1
	Mole Vermelhinho	1
	Sete Semanas	1
Rocha/Treinta y Tres (17)	Angélica	1
	Arco Iris	2
	Blanco Dulce	1
	Boldo	1
	Cateto	1
	Cateto Amarillo	1
	Criollo Amarillo Dulce	1
	Criollo Blanco	1

ANEXO D. (continuação). Nomes locais exclusivos das variedades de milho identificados em diferentes regiões das terras baixas da América do Sul.

Região	Nome local	N°
Rocha/Treinta y Tres (17)	Dulce	1
	Maíz	1
	Morocho	1
	Naranja	1
	Picoca	1
	Pisingallo	1
	Pisingallo Blanco y Colorado	1
	Pisingallo Blanco y Dorado	1
	Pisingallo Colorado	1
Tacuarembó/Rivera (8)	Bagual	1
	Catete Blanco	3
	Colorado Criollo	2
	Cuarentino Dulce	1
	Dulce Blanco	1
	Negro	2
	Pisingallo Rojo	1
	Sangre de Toro	1
Canelones (4)	Anaranjado Forrajero	1
	Blanco Forrajero	1
	Forrajera Amarillo	1
	Forrajera Blanca	1
Total		246

ANEXO E. Valores de usos gastronômicos, representados por uso alimentar, potencial culinário e por atributo do alimento, associados às variedades locais de milho das terras baixas da América do Sul.

Usos gastronômicos		N°	%
Uso alimentar	Milho verde	186	23,9
	Pamonha/Curau	84	10,8
	Bolo/Pão/Broa	80	10,3
	Farinha	65	8,3
	Canjica	48	6,2
	Polenta/Angu	40	5,1
	Mingau	33	4,2
	Cuscuz	24	3,1
	Canjiquinha	16	2,1
	Chicha	16	2,1
	Pipoca	15	1,9
	Fubá	13	1,7
	Munguzá	13	1,7
	Torrado	9	1,2
	Canjicão	7	0,9
	Sopa	5	0,6
	Locro	4	0,5
	Creme	4	0,5
	Farinha de beiju	2	0,3
	Maisena	2	0,3
	Puchero	2	0,3
	Chipa	2	0,3
	Gofio	1	0,1
	Suco	1	0,1
	Torta frita	1	0,1
	Xerém	1	0,1
	Fuba	1	0,1
	Pudim	1	0,1
Potencial culinário/Atributo do alimento	Consistência	8	1,0
	Estoura bem	3	0,4
	Sabor	40	5,1
	Doce	24	3,1
	Maciez	19	2,4
	Saudável/Nutritivo	9	1,2
Total		779	100,0

ANEXO F. Nome local e indígena, nome indígena traduzido, tipo de endosperma, município/estado, origem das variedades locais de milho e etnia (para os indígenas), identificados por meio do levantamento etnobotânico nos estados do Acre (indígenas) e Rondônia (agricultores locais), Brasil. (Não Info.) = Informação não disponível; (-) = Não aplicável.

Nº	Nome	Nome indígena traduzido	Tipo Endosperma	Município/ Estado	Origem	Etnia
1	*Nawã Sheki*	*Duro*	Duro	Feijó/AC	Introduzido	Kaxinawá
2	*Shekihui*	*Amarelo*	Não Info.	Feijó/AC	Local	Kaxinawá
3	*Hushupa*	*Branco*	Não Info.	Feijó/AC	Local	Kaxinawá
4	*Paxi Nipa*	*Colorido*	Não Info.	Feijó/AC	Local	Kaxinawá
5	*Kene Sheki*	*Massa*	Farináceo	Feijó/AC	Local	Kaxinawá
6	*Buneytsu*	*Milho Doce*	Doce	Feijó/AC	Local	Kaxinawá
7	Não Info.	*Duro*	Duro	Feijó/AC	Introduzido	Shanenawa
8	Não Info.	*Massa*	Farináceo	Feijó/AC	Local	Shanenawa
9	Não Info.	*Duro*	Duro	Feijó/AC	Introduzido	Kaxinawá
10	Não Info.	*Massa*	Farináceo	Feijó/AC	Local	Kaxinawá
11	*Sheki Hushupa*	*Branco*	Não Info.	Jordão/AC	Local	Kaxinawá
12	*Sheki Taxipa*	*Massa Vermelho*	Farináceo	Jordão/AC	Local	Kaxinawá
13	*Paxi Sheki*	*Pipoca*	Pipoca	Jordão/AC	Local	Kaxinawá
14	*Sheki Kuî*	*Massa*	Farináceo	Jordão/AC	Local	Kaxinawá
15	*Sheki Kuxi*	*Duro*	Duro	Jordão/AC	Introduzido	Kaxinawá
16	*Sheki Meshupa*	*Preto*	Não Info.	Jordão/AC	Local	Kaxinawá
17	*Sheki Kuî*	*Massa*	Farináceo	Tarauacá/AC	Local	Kaxinawá
18	*Kuxi Sheki*	*Cearense*	Duro	Tarauacá/AC	Introduzido	Kaxinawá
19	*Bunaithi*	*Murcho*	Doce	Tarauacá/AC	Local	Kaxinawá
20	*Sheki Shashapa*	*Pipoca*	Pipoca	Tarauacá/AC	Local	Kaxinawá
21	*Sheki Berutxuri*	*Pipoca*	Pipoca	Jordão/AC	Local	Kaxinawá
22	*Sheki Kuxi*	*Milho Sereso*	Não Info.	Jordão /AC	Introduzido	Kaxinawá
23	*Sheki Rushupa*	*Branco*	Não Info.	Jordão /AC	Local	Kaxinawá
24	*Sheki Kuî*	*Massa*	Farináceo	Jordão /AC	Local	Kaxinawá
25	*Sheki Huî*	*Massa Vermelho e Branco*	Farináceo	Feijó/AC	Local	Kaxinawá
26	Não Info.	*Duro*	Duro	Feijó/AC	Introduzido	Kaxinawá
27	Não Info.	*Pipoca*	Pipoca	Feijó/AC	Local	Kaxinawá
28	*Sheki Kunre*	Não Info.	Não Info.	Não Info./AC	Não Info.	-
29	*Sheki Narê Knã*	Não Info.	Não Info.	Não Info./AC	Não Info.	-
30	*Mole Roxinho*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
31	*Mole Vermelhinho*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-

ANEXO F. (continuação) Nome local e indígena, nome indígena traduzido, tipo de endosperma, município/estado, origem das variedades locais de milho e etnia (para os indígenas), identificados por meio do levantamento etnobotânico nos estados do Acre (indígenas) e Rondônia (agricultores locais), Brasil. (Não Info.) = Informação não disponível; (-) = Não aplicável.

Nº	Nome	Nome indígena traduzido	Tipo Endosperma	Município/ Estado	Origem	Etnia
32	*Mole Amarelinho*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
33	*Cubano*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Local	-
34	*Comum*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
35	*Mole*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
36	*Mole*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
37	*Comum*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Local	-
38	*Sete Semanas*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Local	-
39	*Branco*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Local	-
40	*Massa*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Local	-
41	*Alho*	Não Info.	Pipoca	Guajará-Mirim/RO	Local	-
42	*Milho de Angola*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
43	*Mole*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Local	-
44	*Milho da Produção*	Não Info.	Dentado	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
45	*Duro*	Não Info.	Duro	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
46	*Comum*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
47	*Cubano*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Local	-
48	*Milho para Pamonha*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
49	*Massa*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Local	-
50	*Cubano*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Local	-
51	*Milho da Safra*	Não Info.	Dentado	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
52	*Avermelhado*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Local	-

ANEXO G. Nome local e indígena, nome indígena traduzido, tipo de endosperma, município/estado, origem das variedades locais de milho e etnia (para os indígenas), identificados por meio do levantamento etnobotânico nos estados do Acre (indígenas) e Rondônia (agricultores locais), Brasil. (Não Info.) = Informação não disponível; (-) = Não aplicável.

Nº	Nome	Nome indígena traduzido	Tipo Endosperma	Município/ Estado	Origem	Etnia
53	*Massa*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Local	-
54	*Cubano*	Não Info.	Não Info.	Guajará-Mirim/RO	Local	-
55	*Milho da Produção*	Não Info.	Dentado	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
56	*Pipoca*	Não Info.	Pipoca	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
57	*Mole*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Local	-
58	*Duro*	Não Info.	Duro	Guajará-Mirim/RO	Introduzido	-
59	*Pipoca*	Não Info.	Pipoca	Guajará-Mirim/RO	Local	-
60	*Duro*	Não Info.	Duro	Guajará-Mirim/RO	Local	-
61	*Mole*	Não Info.	Farináceo	Guajará-Mirim/RO	Local	-