

**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

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 certa. 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 Paraíba.

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 Indígenas 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 durante 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 Taitiány 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 oportunidades 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 Frassetto, 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)*

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 regiões 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.

2. 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 regiões 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 científico 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.

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 diversificación del maíz: una revisión 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-Madrigo, 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 microsatellites. *American Journal of Botany* 95:1240-1253.
- 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 diversificación del maíz: una revisión 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). Reunión 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.; McGlenn, 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 agrobiodiversity 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 genética 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 microsatellites. *American Journal 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.