

Betzaida Bernal Rojas

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE VARIEDADES
CRIOULAS DE MILHO PIPOCA CONSERVADAS POR
AGRICULTORES FAMILIARES DOS MUNICÍPIOS DE
ANCHIETA E GUARACIABA NO EXTREMO OESTE DE
SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dra. Juliana Bernardi
Ogliari.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rojas, Betzaida Bernal

Diversidade e estrutura genética de variedades crioulas de milho pipoca conservadas por agricultores familiares dos municípios de Anchieta e Guaraciaba no Extremo Oeste de Santa Catarina / Betzaida Bernal Rojas ; orientadora, Juliana Bernardi Ogliari, 2017.
96 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Variedades crioulas . 3. Milho pipoca. 4. Diversidade genética. 5. Marcadores moleculares. I. Ogliari, Juliana Bernardi . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Betzaida Bernal Rojas

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE VARIEDADES
CRIOULAS DE MILHO PIPOCA CONSERVADAS POR
AGRICULTORES FAMILIARES DOS MUNICÍPIOS DE
ANCHIETA E GUARACIABA NO EXTREMO OESTE DE
SANTA CATARINA**

Esta Dissertação foi julgada e aprovada em 13/12/2016, em sua forma final, pela Orientadora e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Recursos Genéticos Vegetais, pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Juliana Bernardi Ogliari (Presidente/Orientadora-
CCA/UFSC)

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Membro Interno- CCA/UFSC)

Prof. Dr. Maurício Sedrez, dos Reis (Membro Interno- CCA/UFSC)

Prof. Dr. Messias Gonzaga Pereira (Membro Externo- UENF/RJ)

Aos meus pais Mitzila Rojas e
Wilfredo Bernal

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente ao Programa de Pós- Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais Mitzila e Wilfredo, meu irmão Jonathan e meu sobrinho Johao pelo apoio contínuo na busca do meu crescimento pessoal e profissional, mesmo assim significasse suportar a distância física entre nós.

À toda minha família, amigos, colegas da faculdade e trabalho no Panamá, especialmente meus tios Nico e Roberto, os meus amigos Erick, Michelle e Irene e ao meus antigos chefes, o Dr. Abby Guerra e Eng. Carmem Bieberach.

À minha orientadora, Dra. Juliana, por mostrar-se interessada desde o princípio em me orientar e abrir as portas do seu grupo de pesquisa. Assim como pelos valiosos ensinamentos na área de melhoramento genético e trabalho com agrobiodiversidade, que foram transmitidos de forma paciente e entusiasta durante todo este tempo, os quais ajudaram a desenvolver o presente trabalho e me criar novas perspectivas profissionais.

Aos meus caros amigos e colegas do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade: Rose, Tassi, Natália, Kelly, Inês, Rafael, Guilherme, Linda, em especial a Gabriel, pela parceria constante com as pipocas e Estevão e Wagner pela ajuda e amizade oferecida durante o último ano.

Ao professor Dr. Rubens Onofre Nodari e Bernadete por me ajudarem infinitamente nos complicados trâmites para minha vinda ao Brasil.

Ao professor Dr. Maurício Sedrez dos Reis, cujo valioso conselho de “trabalhar com alegria e determinação” dito a todos os estudantes durante um churrasco, foi alisiente para mim, sobretudo em momentos de cansaço e desânimo.

Aos membros da banca pela ajuda e sugestões no aperfeiçoamento do presente trabalho.

Aos colegas do Programa de PPG RGV: Anyela, Liliana, Francis, David, Fernando, Ihanyika, Joana, Thiago, Marcia Rosarrolla, Edison, Marcia Faima, Lido e Juan Carlos por me acompanhar nesta caminhada torcendo constantemente para a culminação deste projeto.

Aos meus queridos amigos na fé em Cristo: o pessoal do Grupo Santa Catarina do movimento de Emaús e o Grupo de Oração Jovem São Francisco de Assis, especialmente Guilherme e Francis e a nossos orientadores espirituais Tio Wilson, Tia Ernesta e Frei Frigo por guiarem os nossos caminhos. Obrigada pelos abraços, pela torcida e pelas orações!

A todos, gratidão!

*Não existe grandeza onde não há simplicidade,
bondade e verdade.*

Leon Tolstói

RESUMO

No presente estudo foram utilizados marcadores SSR para avaliar a estrutura e diversidade genética de variedades crioulas mantidas e conservadas *on farm* por agricultores do Extremo Oeste catarinense, com o objetivo de gerar informações que possam auxiliar no desenvolvimento de futuras estratégias de melhoramento genético participativo na região. Para tanto, foram caracterizadas 500 plantas com um total de seis primers de microssatélites. Em dez populações analisadas, foi encontrado um total de 18 alelos e uma média de 2,68 alelos por loco polimórfico com heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e) de 0,46 e 0,49, respectivamente. As estimativas das estatísticas F de Wright indicaram baixos níveis de endogamia ($FIS= 0,066$) e níveis consideráveis de diferenciação entre as populações ($FST=0,195$). As populações 880A, 574A e 66A apresentaram a maior proporção de plantas heterozigóticas, sendo por isso e pela boa performance consideradas promissoras para o desenvolvimento de programas de melhoramento intrapopulacionais. Por sua vez, as populações 880A, 244A, 2360A, 319E, 884B, 283A, 857C e 574A poderiam ser encaminhadas para a realização de estudos em esquema dialélico, visando a formação de compostos, híbridos intervarietais ou o desenvolvimento de programas de seleção recorrente recíproca. Estes resultados revelam que as variedades crioulas de milho pipoca dessa região são populações estruturadas e com níveis consideráveis de heterozigosidade. Essas particularidades podem contribuir para a ampliação da diversidade genética em programas de melhoramento genéticos de milho pipoca.

Palavras-chave: marcadores microssatélites, conservação *in situ- on farm*, milho pipoca.

ABSTRACT

In this study, SSR markers were used to evaluate the structure and genetic diversity of landrace varieties maintained and stored *on farm* by farmers from the far west of Santa Catarina aiming to generate information that may assist in the development of future strategies of participatory genetic improvement in the region. Therefore, 500 plants were characterized with a total of six microsatellite primers. In ten analyzed populations, a total of 18 alleles and an average of 2.68 alleles per polymorphic locus were found with observed (H_o) and expected (H_e) mean heterozygosities of 0,46 and 0,49 respectively. Estimates of Wright's F-statistics indicated low levels of inbreeding ($FIS = 0.066$) and considerable levels of differentiation among populations ($FST = 0.195$). The populations 880A, 574A and 66A presented the highest proportion of heterozygous plants, being for that reason and for its good performance that they were considered promising for the development of intrapopulation breeding programs. On the other hand, populations 880A, 244A, 2360A, 319E, 884B, 283A, 857C and 574A may be referred for diallelic scheme studies for composite synthesis, intervarietal hybrids or development of reciprocal recurrent selection programs. These results show that the landraces varieties of popcorn maize in this region are structured populations, and with considerable levels of heterozygosity. These particularities can contribute to the expansion of genetic diversity in breeding programs of popcorn maize.

Keywords: Microsatellite markers, *in situ- on farm* conservation, popcorn maize.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Provas de Gradiente PCR para otimização de primers microssatélites. Electroforeses em gel de agarose (3%), 80 volts, 1.5 horas de duração, Amostra de DNA utilizado número 311. As faixas de temperaturas dos gradientes foram estimadas a partir do cálculo da T Melting de cada par de primer..... 55
- Figura 2.** Distância genética entre dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina. O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA (coeficiente de correlação cofenética= 0,742).....64
- Figura 3.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina, utilizando o software GeneALEx.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca de Anchieta e Guaraciaba, Santa Catarina	43
Tabela 2. Estratégias de manejo e seleção praticadas pelos agricultores de Anchieta e Guaraciaba para a conservação de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca.....	44
Tabela 3. Condições do programa PCR utilizado para a amplificação dos loco microssatélites.....	47
Tabela 4. Primers microssatélites de milho otimizados para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	54
Tabela 5. Sequências dos primers microssatélites utilizados para o estudo da diversidade genética de 10 populações de variedades crioulas de milho pipoca crioulo, sequência repetitiva, posição nos cromossomos, temperatura de anelamento e número e tamanhos de amplificação dos alelos detectados.....	56
Tabela 6. Frequências alélicas de seis locos de microssatélites para dez populações de variedades crioulas de milho pipoca de Anchieta e Guaraciaba, no Extremo Oeste de Santa Catarina.....	58
Tabela 7. Frequências alélicas (p) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) estimados para seis locos de microssatélites e com base nos totais de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina.....	59
Tabela 8. Índices de diversidade genética estimados para seis locos de microssatélites e com base nos dados totais de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina.....	60
Tabela 9. Índices de diversidade genética para dez populações de variedades crioulas de milho pipoca baseado em dados médios de seis locos de microssatélites.....	61
Tabela 10. Estatísticas F de Wright para os seis locos de microssatélites analisados nas dez populações de variedades crioulas de milho pipoca de Anchieta e Guaraciaba, Extremo Oeste de Santa Catarina.....	62
Tabela 11. Estimativas de F_{ST} par a par entre as dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina.....	63

Tabela 12. Matriz de Distância Genética de Nei para as dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina.....	64
Tabela 13. Estudos de diversidade genética referenciados na literatura com variedades de milho.....	68

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2.	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	25
2.1	Importância econômica do milho pipoca no Brasil	25
2.2	Melhoramento genético de milho pipoca no Brasil.....	25
2.3	Termos usados para as variedades conservadas <i>on farm</i>	28
2.4	Variedades locais de milho pipoca no Extremo Oeste catarinense.....	30
2.5	A importância da agricultura familiar na manutenção da agrobiodiversidade.	34
2.6	Importância do estudo da diversidade genética no melhoramento de plantas	36
2.7	Marcadores moleculares.....	37
3.	OBJETIVOS.....	39
3.1	Objetivo geral.....	39
3.2	Objetivos específicos.....	39
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	Material Vegetal.....	41
4.2	Coleta e armazenamento do tecido foliar	45
4.3	Extração de DNA	45
4.4	Verificação de qualidade e quantificação de ADN.....	46
4.5	Otimização de primers microssatélites	46
4.6	Análise da diversidade.....	47
4.7	Análises estatísticas.....	48
4.7.1	Cálculo de frequências alélicas (p).....	48
4.7.2	Cálculo de Estatísticas descritivas	48
4.7.3	Medidas de estrutura populacional.....	50
4.7.4	Análises de Distância Genética	51

4.7.5	Análise de Agrupamento.....	51
4.7.6	Análise molecular de variância – AMOVA.....	51
5.	RESULTADOS.....	53
5.1	Otimização de primers microssatélites.....	53
5.2	Análise da diversidade	55
6.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	67
7.	CONCLUSÕES	79
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No Brasil, o cultivo de milho pipoca tem aumentado nos últimos anos, sendo um produto alimentício de grande aceitação dentro do mercado nacional (PAULA et al., 2010; RINALDI, 2007). Com preços até três vezes maior do que o milho comum, a pipoca é considerada uma cultura de elevada rentabilidade, exercendo um impacto positivo em vários setores da economia nacional (RANGEL et al., 2011). Presente tanto nas grandes como nas pequenas cidades, o consumo da pipoca faz parte da alimentação do brasileiro, especialmente em momentos de lazer.

O Brasil posiciona-se como o segundo maior produtor mundial de milho pipoca, estando atrás apenas dos Estados Unidos. Segundo o Anuário Brasileiro do Milho de 2016, houve uma produção recorde de 255 mil toneladas, na safra 2014, no estado de Mato Grosso (KIST et al., 2016). Considerado o maior produtor de milho pipoca no Brasil, o estado de Mato Grosso é responsável por mais de 80% da produção nacional.

Apesar da existência de um mercado dinâmico e em contínuo crescimento, existem muitas fragilidades no cultivo de milho pipoca. Há poucos dados oficiais com respeito a área semeada, quantidade da produção, cadeia produtiva e mercado, o que dificulta o estabelecimento de parâmetros econômicos. As poucas informações existentes provêm das empresas privadas e empacotadoras que atuam em parceria com os agricultores, fornecendo as sementes e comprando total ou parcialmente a produção (PEREIRA FILHO et al., 2016).

Outra fragilidade é a limitada quantidade de cultivares melhoradas registradas em relação à crescente demanda pelo produto, além do fato da maioria delas possuírem base genética estreita (SILVA et al., 2009; PAULA et al., 2010). A ausência de cultivares com favoráveis características agrônômicas e elevada capacidade de expansão estão entre as principais dificuldades para os agricultores, cujo foco é a produção para fins comerciais (MIRANDA et al., 2008; RINALDI et al., 2007; SCAPIM et al., 2010). Tal fato contribuiu para que o mercado brasileiro aceitasse e dependesse dos híbridos americanos, que possuem qualidade, rendimento e índices de capacidade

de expansão superiores aos cultivares nacionais (SAWAZAKI, 2001; RIBEIRO TRINDADE et al., 2010).

Neste sentido, uma das alternativas para aumentar a variabilidade genética dos programas de melhoramento é explorar a variabilidade, que se encontra conservada *in situ-on farm* (ZEVEN, 1998; BERED et al., 2005). Os recursos genéticos conservados nas propriedades campo dos agricultores são de grande importância, tanto para os agricultores como para os melhoristas, uma vez que constituem a matéria prima necessária para responder às mudanças climáticas, pragas e doenças (GOVINDARA et al., 2015; DYER, 2014).

No Brasil, inexistem informações de literatura sobre o potencial genético do milho pipoca conservado *on farm*. A maioria dos estudos de diversidade genética são feitos sob coleções conservadas *ex situ*, em bancos de germoplasma pertencentes a programas de melhoramento genético, cujos principais objetivos são conhecer a estrutura e a variabilidade genética destes materiais e avaliar sua similaridade, visando a identificação de grupos heteróticos para serem utilizados em futuros cruzamentos (CARVALHO et al., 2013; PENA et al., 2016; DANDOLINI et al., 2008; ELOI et al., 2012).

Entretanto, desde 2005, diversos estudos realizados pelo Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABio) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) tem destacado o Extremo Oeste catarinense como uma região rica em diversidade de variedades crioulas de várias espécies (VOGT, 2005; OGLIARI et al., 2007; OSORIO, 2015; SOUZA, 2015; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2016; COSTA et al., 2016). De 2011 a 2013, foi desenvolvido em parceria com organizações locais, o Censo da Diversidade de *Zea mays* L., em três municípios do Oeste de Santa Catarina. Em dois destes municípios (Anchieta e Guaraciaba), o Censo identificou um total de 1513 populações de milho (comum, pipoca, farináceo e doce), das quais 1078 corresponderam a milho pipoca (COSTA et al., 2016), convivendo simpatricamente com populações de teosinto (SILVA et al., 2015).

Como resultado das análises do Censo com relação à caracterização dos grãos, nomes locais, valores de uso, agrônômicos e adaptativos, além da distribuição espacial das variedades, confirmou a existência de uma significativa diversidade genética para o milho comum, doce, farináceo e pipoca. Dentre estes, o milho pipoca, conservado principalmente pelas mulheres, apresenta uma grande aceitação dentro das comunidades, por ser utilizado principalmente para a alimentação familiar, muitas delas associadas a características nutricionais especiais (COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2016). Assim,

existe uma forte tradição de consumo de milho pipoca, que contribui para que algumas variedades sejam conservadas pela mesma família há mais de 60 anos. O tempo de conservação, aliado ao uso reduzido de insumos, são fatores determinantes para o desenvolvimento de adaptações às condições locais, explicando a resistência destas variedades a doenças e fatores climáticos adversos (SILVA, 2015).

Além disso, estas variedades apresentam características gastronômicas interessantes quanto a maciez, rendimento de panela e sabor (SILVA et al., 2015). Pesquisas posteriores permitiram a identificação de cinco raças de milho pipoca, três das quais são diferentes das raças de milho pipoca do resto da América (SILVA et al., 2016). Além disso, ensaios realizados por Gonçalves (2016) revelam boas médias de produtividade de grãos, capacidade de expansão e resistência a doenças para algumas das variedades.

As variedades crioulas de milho pipoca em conjunto com o conhecimento tradicional dos agricultores podem ser de grande importância no desenvolvimento de programas de melhoramento genético participativo na região do oeste catarinense. O elevado potencial agrônomo, adaptativo e culinário torna essas variedades materiais promissores para a criação de novos nichos de mercado, que poderiam ajudar na geração de renda para a agricultura familiar desta região e, conseqüentemente, na conservação pelo uso destes recursos fitogenéticos.

Com a finalidade de ampliar o conhecimento da diversidade e estrutura genética do milho pipoca existente na região, o presente estudo teve por objetivo caracterizar a diversidade genética de dez populações crioulas de milho pipoca mediante o uso de marcadores de microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR). Estas informações contribuirão para a elaboração de estratégias de melhoramento genético participativo de milho pipoca para a região Extremo Oeste catarinense.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Importância econômica do milho pipoca no Brasil

O milho pipoca é um tipo de milho especial muito apreciado no Brasil. Constitui uma das mais eficientes fontes calóricas de alimento produzidas por área, podendo ser armazenada com baixo custo por um longo período de tempo e facilmente processada pelo consumidor final (BRUGNERA et al., 2003). É considerada uma cultura de elevada rentabilidade por causa de sua grande aceitação no mercado e por movimentar a economia informal (RANGEL et al., 2011). O cultivo limita-se, principalmente, a pequenos agricultores, mas com a participação de alguns poucos grandes produtores empresariais que mantêm o produto sempre em oferta atendendo às demandas das empresas empacotadoras e do comércio (PEREIRA FILHO et al., 2016).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de milho pipoca. Embora seu consumo tenha aumentado nos últimos anos, diversos autores ressaltam que a quantidade produzida no país não tem sido suficiente para suprir as necessidades do mercado e diminuir as importações de sementes, provenientes principalmente da Argentina e dos Estados Unidos (RANGEL et al., 2008; FREITAS JÚNIOR et al., 2009; SCAPIM et al., 2006). Além do anterior, existe pouca informação oficial com respeito a sua produção e mercado. Segundo a EMBRAPA, o estabelecimento de parâmetros econômicos é difícil, em razão da ausência de dados sobre a área semeada, quantidade produzida, compradores de grãos e produtores de sementes. Sawazaki (2010) resalta que os dados disponíveis têm sido fornecidos através da mídia, estimulado por empresários envolvidos neste setor.

As regiões de Nova Prata – RS e Campos Novos do Parecis – MT destacam-se como as regiões mais produtoras de milho pipoca no Brasil. Nestas regiões, atuam grandes empresas empacotadoras de milho pipoca que trabalham em parceria com os produtores fornecendo as sementes e comprando parcial ou totalmente a produção (SAWAZAKI, 2010).

2.2 Melhoramento genético de milho pipoca no Brasil

No melhoramento genético de milho pipoca, vários aspectos relacionados a qualidade da pipoca e as características agrônômicas devem ser considerados, uma vez que os agricultores estão mais

interessados em obter elevados rendimentos, enquanto os consumidores estão mais interessados na capacidade de expansão, que oferece à pipoca uma maior textura e maciez (SCAPIM et al., 2002; RESH et al., 2015).

O milho pipoca (*Z. mays* L. var. *microsperma* (Koern.) Asch. et Graebn.), é considerado como um tipo de milho especial. Devido ao seu tipo de grão, que é duro, pequeno e de pericarpo mais espesso, tem a capacidade de se expandir quando aquecido a aproximadamente 180°C (ZIEGLER, 2000). A capacidade de “estourar” deve-se à pressão que o óleo e a umidade do grão exercem sobre o pericarpo quando aquecido, produzindo o seu rompimento e a exposição do endosperma (ZINSLY & MACHADO, 1978).

Os grãos do milho pipoca são variáveis quanto ao formato, tamanho e coloração. Podem apresentar grãos redondos, chatos ou pontiagudos e colorações amarela, alaranjada, rosa, creme, vermelha, roxa, preta ou azul. A maior aceitação comercial é de grãos redondos, tipo pérola e com endosperma amarelo a laranja (SILVA et al., 2016; SAWAZAKI, 2010; ZINLY & MACHADO, 1978). O grão de milho pipoca é rico em carboidratos, proteínas, fibras e vitaminas do complexo B. Além disso, possui bom potencial calórico, pois é constituído de elevadas quantidades de açúcares e gorduras (SAWAZAKI, 1986).

Em contraste com o milho comum, as plantas de milho pipoca são mais precoces, prolíficas, de menor tamanho, com menor número de folhas, maior tamanho de pendão, menos vigorosas, de lento crescimento, espigas menores, maior susceptibilidade a pragas e doenças e menor produtividade de grãos. Também é mais suscetível ao acamamento e quebraimento do colmo, podridões de espigas e de grãos, necessitando também cuidados especiais durante a colheita e secagem dos grãos, de forma a evitar possíveis danos no pericarpo e no endosperma (SAWAZAKI, 2010).

A capacidade de expansão (CE) é o principal parâmetro de qualidade do milho pipoca (SCAPIM et al., 2002; ARNHOLD et al., 2010; RUFFATO et al., 2000). É calculado pelo volume de pipoca obtido versus o volume de grãos utilizados (RUFFATO et al., 2000; BRUGNERA et al., 2003). Quanto maior a capacidade de expansão, melhor é a qualidade da pipoca, ressaltam Miranda et al. (2011) e Zinsly & Machado (1978). Diversos fatores genéticos e ambientais afetam a CE do milho pipoca, assim como as condições de desenvolvimento em campo, de colheita e pré-processamento (RUFFATO et al., 2000).

No Brasil, segundo a normativa nº 61 de 22 de dezembro de 2011 do MAPA, o grão de milho pipoca deve possuir uma CEX superior a 30 mL.g⁻¹. (BRASIL, 2011).

Apesar dos programas de melhoramento genético no Brasil e Estados Unidos terem iniciado ao mesmo tempo, poucos programas têm sido conduzidos no Brasil, dificultando a obtenção de bons genótipos e resultando na dependência de grãos e sementes de cultivares norte-americanos, que são cultivados no Brasil em parcerias com companhias empacotadoras (SAWAZAKI, 2001; RANGEL et al., 2008).

No mercado brasileiro, existe uma quantidade limitada de cultivares melhoradas registradas em relação à crescente demanda pelo produto (SCAPIM, 2010; SAWAZAKI, 2010). A maioria possui base genética estreita (PAULA et al., 2010). Além disso, a principal restrição para o cultivo é a ausência de cultivares com favoráveis características agronômicas, elevada capacidade de expansão e adaptadas às diferentes regiões do país (MIRANDA et al., 2003; RINALDI et al., 2007; SILVA et al., 2009; SCAPIM et al., 2010).

Até outubro de 2016, somente 75 cultivares de milho pipoca foram registradas no Sistema Nacional de Proteção de Cultivares. Deste total, somente 14 pertencem a instituições públicas de pesquisa: O Instituto Agrônomo registrou 12 cultivares e a Universidade Estadual do Norte Fluminense, duas cultivares.

No melhoramento de milho pipoca, os métodos são os mesmos daqueles aplicados em programas de melhoramento de milho comum (ZINLY & MACHADO, 1978). Para Scapim (2010), as características de maior importância no melhoramento genético de milho pipoca são a capacidade de expansão, a produtividade e a tolerância às doenças, razão pela qual avaliar genótipos para estas características é de vital importância. Porém, muitos autores afirmam que a produtividade de grãos está inversamente correlacionada à capacidade de expansão (SAWAZAKI, 1995; COIMBRA et al., 2001; MIRANDA et al., 2003), dificultando o ganho de seleção simultâneo para as duas características por meio do melhoramento populacional (MIRANDA et al., 2003).

O melhoramento genético de milho pipoca possui duas alternativas de desenvolvimento de cultivares: a obtenção de populações melhoradas de polinização aberta e híbridos. Para o melhoramento de populações, são utilizados métodos de seleção recorrente, que possibilitam o aumento gradativo da frequência dos genes favoráveis, enquanto para o melhoramento de híbridos, o objetivo é a obtenção de linhagens endogâmicas, que quando estão em combinações adequadas,

produzem híbridos muito superiores às populações de origem (PATERNIANI & MIRANDA FILHO, 1978).

Com relação ao melhoramento intrapopulacional, Scapim (2010) sugere que há possibilidade de seleção de genótipos de interesse a partir de populações que possuam ampla variabilidade genética e elevadas médias, permitindo o desenvolvimento de novas variedades para seu uso *per se*.

Por outro lado, diversos estudos de divergência genética têm sido feitos para orientar os programas de melhoramento genético de milho pipoca no Brasil (SILVA et al., 2015; DANDOLINI et al., 2008; SILVA et al., 2009). Esses estudos permitem um melhor entendimento da diversidade genética existente entre as populações de milho pipoca, que constituem as coleções de germoplasma, com a finalidade de direcionar a formação de grupos heteróticos (PENA et al., 2016).

2.3 Termos usados para as variedades conservadas *on farm*

O termo variedade local é complexo e amplo, não existindo um conceito que seja universalmente aceito (VILLA et al., 2005). Muitos sinônimos têm sido usados, tal como *landraces*, variedades locais, primitivas, tradicionais e variedades dos agricultores (ZEVEN, 1998; VILLA et al., 2005).

Por muitas décadas, diversos autores tentaram definir o que são as variedades locais, sem haver um consenso completo entre as definições. Segundo Zeven (1998), a primeira definição encontrada na literatura foi de von Runker (1908), afirmando que as variedades locais são aquelas que levam o nome da região e onde têm estado desde tempos imemoriais. Este mesmo autor, após estudar muitas definições e estabelecer os principais aspectos envolvidos na natureza das variedades locais, concluiu que uma variedade local “tem uma natureza complexa e indefinível e que, por isso, não pode ser dada uma definição completamente abrangente”. Porém, ele sugere a definição dada por Mansholt's, em 1909, como a melhor, ou seja, “uma variedade local autóctone é aquela que possui grande capacidade para tolerar estresses bióticos e abióticos, resultando numa elevada estabilidade e rendimento intermediário, em condições agrícolas de baixos insumos”.

Para Rieger et al. (1991), uma variedade local refere-se a “uma população geograficamente distinta, que está sob cultivo e é diversa em sua composição genética, tanto dentro como entre as populações. Elas diferem das variedades melhoradas porque não têm sido incluídas dentro do melhoramento moderno, no qual elas seriam selecionadas para

atingir um determinado nível de homogeneidade e patamar de rendimento”. O fato das variedades locais serem “variedades de agricultores”, livres de melhoramento formal, também é reforçada por vários autores como Louette et al. (1997), Machado et al. (2008) e Ogliari et al. (2013).

Teshome et al. (1997) dão uma definição mais ampla incluindo outros fatores, definindo-as como populações de plantas variáveis, que estão adaptadas às condições agroclimáticas e que são nomeadas, selecionadas e mantidas por agricultores tradicionais para satisfazerem suas necessidades sociais, econômicas, culturais e ecológicas.

Villa et al. (2005) destacam que, embora seja difícil ter uma definição totalmente aceita por todos os grupos envolvidos no uso e conservação das variedades locais, é possível propor uma definição de trabalho, que reúna as principais características em comum associadas aos diferentes termos mais frequentes. Assim, ele propôs o termo variedade local como “uma população dinâmica de uma espécie cultivada, que tem uma origem histórica, identidade distinta e ausência de melhoramento formal, sendo com frequência geneticamente diversa, localmente adaptada e associada a sistemas agrícolas tradicionais”. O autor esclarece que, na prática, as variedades locais são identificadas por agricultores e conservacionistas com base nessas características, mas enfatiza que não existe uma característica ou conjunto delas que seja absoluta na definição e identificação de uma variedade local e que igualmente abrange totalmente todos os tipos de cultivo e agroecossistemas no qual elas se desenvolvem. Tal ressalva deve-se ao fato de existirem diversos fatores que devem ser considerados como a biologia reprodutiva da espécie, os processos de domesticação envolvidos, os propósitos de manejo e produção, inclusive a finalidade pela qual a definição está sendo aplicada.

As variedades locais e/ou tradicionais por meio de processos de seleção natural e humana apresentam adaptação ao ambiente no qual têm sido cultivadas (ZEVEN, 1998; OGLIARI et al., 2007; MACHADO et al., 2008) e aos sistemas de cultivo que o agricultor adota, considerando ainda que tais sistemas trazem consigo valores sociais e culturais a partir da ótica do agricultor (MACHADO et al., 2008). Esta adaptação às condições locais torna as variedades locais fonte de genes para o desenvolvimento de novos cultivares melhorados (OGLIARI et

al., 2007) ou também fontes para transferir características desejáveis às variedades comerciais (LOUETTE et al., 1997).

Além dos aspectos agrônômicos, biológicos, ecológicos, culturais e conservacionistas, que giram em torno a definição das variedades locais, aspectos de origem econômica e jurídica também são levados em conta. Assim, Santilli (2012) explica que as normativas que regulam a produção, comercialização e utilização das variedades locais torna-se motivo de constante discussão, pelo fato das variedades locais serem de uma natureza geneticamente heterogênea e, dessa forma, não se encaixam sob os critérios de homogeneidade, distinção e estabilidade exigidos pelo mercado de sementes. Neste ponto, a Lei de Sementes brasileira (Lei 10.711/2003) define cultivar local, tradicional ou crioulo como “a variedade desenvolvida, adaptada ou produzida por agricultores familiares, assentados da reforma agrária ou indígenas, com características fenotípicas bem determinadas e reconhecidas pelas respectivas comunidades e que, a critério do Ministério da Agricultura, considerados também os descritores socioculturais e ambientais, não se caracterizem como substancialmente semelhantes aos cultivares comerciais”. Assim, no que diz respeito ao melhoramento formal, Villa et al. (2005) definem o termo variedade comercial como aquela população resultante de técnicas e práticas baseadas em princípios genéticos, utilizados no desenvolvimento de cultivares, seja por técnicas clássicas ou tecnológicas, usadas dentro de programas de melhoramento de cultivares.

Considerando as definições acima descritas e para referência no presente trabalho, os termos variedades locais, crioulas e tradicionais serão usadas indistintamente como sendo as variedades das espécies cultivadas, que são manejadas, selecionadas, produzidas e usadas pelos pequenos agricultores e que levam consigo uma tradição de cultivo, independentemente do local de origem geográfica. O termo população fará referência a um lote de semente particular conservado por um agricultor em sua unidade de produção familiar, independentemente da similaridade que estabeleça com outras populações de mesma espécie da região de cultivo.

2.4 Variedades locais de milho pipoca no Extremo Oeste catarinense

Nas últimas décadas, a região Extremo Oeste do estado de Santa Catarina (EOSC) sofreu um processo de erosão e perda da diversidade biológica da agricultura e de conhecimentos informais (GREGOLIN,

1999) Apesar disto, a região EOSC (Extremo Oeste de Santa Catarina) apresenta uma significativa diversidade de variedades crioulas conservada por agricultores familiares (OGLIARI et al., 2013; COSTA, 2013; CANCI, 2006). Segundo Canci (2006), “no Extremo Oeste catarinense, é a agricultura familiar que mantém a agrobiodiversidade em uso”.

Desde o ano 2002, muitos trabalhos de resgate, caracterização e conservação de variedades crioulas vêm sendo desenvolvidos pelo Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABio) da UFSC, em parceria com diferentes instituições, organizações e agricultores dos municípios de Anchieta e Guaraciaba, no Extremo Oeste catarinense. Durante os anos 2011 e 2012, no âmbito do Projeto MAYS I, foi realizado o Censo da Diversidade de Milho, cujo objetivo foi identificar variedades crioulas de milho comum, doce e pipoca, conservadas *in situ-on farm* e fornecer subsídios para a elaboração de estratégias de conservação e uso sustentável de variedades crioulas de *Zea mays* L. Seguidamente, uma segunda parte do projeto, contemplou aprofundar em questões relacionadas ao cultivo, manejo, seleção, uso e conservação destas variedades por parte dos agricultores (COSTA, 2013; SILVA, 2015; COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2016), por meio de uma metodologia intitulada Diagnóstico da Diversidade (SILVA, 2015; SILVA et al., 2016).

No caso do milho pipoca, o Censo (COSTA et al., 2016) revelou importantes informações, dentre elas destacam-se:

- O cultivo, manejo e conservação é exclusivamente exercido pelas mulheres.
- A cultura do milho pipoca possui uma forte participação na agricultura familiar, encontrando-se uniformemente distribuída nos municípios. Mais de uma variedade de milho pipoca pode ser cultivada na mesma propriedade. Esta cultura apresenta um sistema de produção particular e diferenciado dos demais tipos de milho (comum, doce e farináceo), sendo cultivado principalmente na área da horta, entre as “miudezas”, sendo este um termo usado pelas agricultoras para fazer referência às espécies exclusivas para a alimentação da família. As áreas de cultivo são pequenas e as práticas de isolamento (temporal e/ou espacial) são efetuadas para impedir o fluxo gênico

derivado de outra variedade de milho pipoca e sobretudo de outras variedades de milho comum, pois segundo as agricultoras, o grão do milho não estoura se o mesmo estiver contaminado por pólen de milho comum. Todavia, a distância e o tempo, em geral, não são suficientes para efetivamente evitar o fluxo gênico. A manutenção das variedades tem sido conquistada por meio das práticas de seleção de semente.

- A maioria das agricultoras manifestou não fazer nenhum controle fitossanitário, indicando que as mais antigas podem ter desenvolvido algum valor adaptativo frente aos fatores de estresse biótico. Existem redes de intercâmbio de sementes das variedades locais de milho pipoca conservadas em Anchieta e Guaraciaba, principalmente entre vizinhos (29 %) e familiares (26 %).
- O tempo de cultivo destas variedades está associado a tradições familiares. Assim, o tempo mínimo de cultivo de uma variedade de milho pipoca na mesma propriedade foi de 1 ano para ambos os municípios, com médias de cultivo de 12,6 anos, para o município de Anchieta, e 11 anos, para o município de Guaraciaba. As variedades mais antigas estão sendo cultivadas pela mesma família há 70 e 100 anos, em Anchieta e Guaraciaba, respectivamente. Por outro lado, as variedades que estão sendo cultivadas há menos de 5 anos na propriedade podem estar na região há mais tempo, considerando que significativa proporção de agricultores receberam as sementes como herança de família ou de vizinhos.
- Os agricultores utilizam diferentes nomes locais para referir-se a suas variedades a fim de identificá-las com base nas suas características individuais. Igualmente, existe uma grande diversidade de grupos morfológicos quanto à classificação do grão (cor, formato e tamanho). Esta diversidade, baseada nas características do grão reportou ser mais elevada do que a diversidade encontrada para os demais tipos de milho. Assim, em ambos os municípios, o milho pipoca reportou as seguintes cores: branco, preto, alaranjado, amarelo, roxo, multicolor e vermelho; com grãos de tamanho pequeno, longo ou médio de formatos redondos, pontudos e intermediários.

- Significativa diversidade de valores de uso, adaptativos e agronômicos foi encontrada, destacando os potenciais genéticos das variedades conservadas *on farm* na região. A categoria *Gastronômica* foi a mais citada, exibindo a importância da pipoca na cultura familiar. As categorias *Gastronômica*, *Agronômica*, *Adaptativa* e *Estética* apresentaram aspectos relevantes para programas de melhoramento genético de milho-pipoca, das quais pode-se citar maciez, sabor, crocância, sequinha quando estoura, branca e sem casca grossa quando estoura, aspectos relacionados à capacidade de expansão como volume e estourar bem, aspectos agronômicos e adaptativos como precocidade, prolificidade, produtividade, fácil de debulhar, menor tempo de secagem no campo, amplitude de adaptação a diferentes locais, resistência à caruncho, resistência à doenças, resistência à cruzamentos com o milho (não “*castiça*”) e valores estéticos quanto ao grão.
- Estratégias de seleção e melhoramento são efetuadas pelas agricultoras, sendo que a espiga e o grão são os principais atributos da planta avaliados para este fim. Este processo responde a alguns critérios de seleção. Assim, de um total de 16 critérios de seleção, os principais foram “espigas bonitas” “arranjo de fileiras” e “forma do grão”.
- Dentre as agricultores-mantenedoras de variedades crioulas, existe um padrão dominante com relação ao manejo da cultura do milho pipoca. A maioria destes conhecimentos foram apreendidos com suas mães e/ou avós. Esse fato reflete a elevada riqueza de conhecimento tradicional associado ao cultivo de milho pipoca.
- Existem processos de perda de variedades identificados na região, a maioria deles decorrentes do abandono do cultivo de pipoca, de não gostar da variedade e também devido a seca. Um total de 201 variedades foram perdidas entre 2011 a 2013, nos dois municípios. Esse momento correspondeu ao período em que foram aplicados os dois questionários na região, ou seja, Censo da Diversidade e Diagnóstico da Diversidade.

- Com base em características morfológicas de grão indicadas pelos agricultores, a diversidade das populações de milho pipoca conservadas *on farm* em Anchieta e Guaraciaba, expressa pelo índice de Shannon, revela valores equivalentes ou superiores aos principais bancos de germoplasma brasileiros e estrangeiros.

Com base nesses estudos, pode ser afirmado que “a diversidade genética das variedades crioulas de milho na região é produto de um processo de manejo dinâmico realizado pelos agricultores” (COSTA 2013; COSTA et al., 2016).

2.5 A importância da agricultura familiar na manutenção da agrobiodiversidade.

As regiões com predominância na agricultura familiar e indígena é que usam e conservam a maior parte da agrobiodiversidade, em âmbito mundial (CARVALHO, 2003). Assim, a agrobiodiversidade para muitos grupos se constitui em um patrimônio cultural (STELLA et al., 2006).

A agricultura familiar refere-se ao exercício de todas as atividades agrícolas de base familiar, relacionada a vários aspectos do desenvolvimento rural. Assim, é a família quem trabalha e gera produtos, bens e serviços (FAO, 2014; SCHNEIDER, 2014). Os agricultores familiares promovem sistemas de manejo e conservação agrícola, ajudando a preservar os agroecossistemas e os produtos alimentícios tradicionais, contribuindo na manutenção da segurança alimentar a escala local, regional e nacional e da agrobiodiversidade (ALTIERI & TOLEDO, 2011). Além disso, tem impacto socioeconômico, pois dinamiza as economias locais gerando emprego e renda (SANTILLI, 2012).

A agricultura familiar caracteriza-se pela prática das agriculturas tradicionais, que são sistemas locais de produção e cujas técnicas de cultivo vêm sendo utilizadas amplamente. Este tipo de agricultura é praticado em pequena escala, pois sua prioridade é o abastecimento da família e das comunidades, o que leva à produção de uma significativa variedade de produtos. Os recursos naturais e a mão de obra são utilizados de forma intensiva, evitando-se o uso de insumos químicos e grandes maquinários (MEIRELES & RUPP, 2006).

Desta forma, a biodiversidade constitui o elemento chave destes sistemas de pequena agricultura, sendo os pequenos agricultores que contribuem na domesticação e manutenção de diversas variedades

vegetais e raças de animais rústicos e com resistência ao clima e fatores adversos (FAO, 2013). Estes sistemas constituídos por extensas e complexas redes sociais ajudam a promover o intercâmbio de sementes, variedades e conhecimentos agrícolas, tendo assim um papel fundamental na conservação da diversidade genética (SATILLI, 2012).

Para Walter de Boef. (2007), os agricultores sempre foram e ainda são os principais curadores ou guardiões da agrobiodiversidade. Segundo ele, o sistema dos agricultores está caracterizado pelo dinamismo das suas práticas, pois são eles que selecionam cultivos e variedades para plantar, armazenar e replantar as sementes. Suas práticas de manejo em combinação com processos naturais promovem um sistema de evolução contínua dos cultivos. Assim, o agricultor torna-se o principal ator na produção das suas sementes e o desenvolvimento do seu cultivo, mantendo a diversidade genética. Sem agricultor não há agrobiodiversidade, declara Emperaire (2002).

Estes sistemas locais de produção, também chamados de sistemas “informais”, vem sendo ameaçado pelo agronegócio e pelas práticas de agricultura extensiva, cuja produção é baseada nas monoculturas, que requerem elevado uso de insumos químicos e maquinários agrícolas, além da adoção de pacotes tecnológicos que trazem consigo a uniformização dos sistemas produtivos (SANTILLI, 2012).

Este tipo de sistema traz múltiplos impactos negativos de natureza social, econômica e ecológica. Estas tecnologias intensivas afetam o ecossistema agrícola, causando contaminação por agrotóxicos, erosão dos solos, aumento das emissões de dióxido de carbono na atmosfera, êxodo rural e redução da diversidade de espécies e das práticas e conhecimentos agrícolas, que estão associados aos sistemas tradicionais de produção. A consequência é principalmente a substituição das variedades locais amplamente adaptadas aos locais, pelas variedades homogêneas de estreita base genética (RIBEIRO, 2007; KILLEBREW & WOLFF, 2010; FRISON et al., 2011).

Soares (1998) adverte que esta modernização da agricultura vem reduzindo de forma acelerada e contínua o uso de variedades locais, concentrando-se apenas naquelas que mostram elevados patamares de produtividade e resposta ao uso de fertilizantes, causando a redução da variabilidade genética destas novas cultivares, os quais tornam-se vulneráveis a pragas e doenças e altamente exigentes a balanços hídricos e nutricionais. O sistema agroindustrial também contribuiu para a,

concentração de espécies responsáveis pela alimentação humana através de um mercado de alimentos, baseado em “commodities”, deixando de lado espécies úteis para a segurança alimentar em nível local e regional.

2.6 Importância do estudo da diversidade genética no melhoramento de plantas

Bered et al. (1997) ressaltaram a importância do melhoramento genético para o incremento da adaptabilidade e produtividade dos cultivos, indicando que para a obtenção de progresso genético é necessário um conhecimento detalhado da constituição genética das espécies. Segundo esses autores, dois aspectos são fundamentais no planejamento de um programa de melhoramento genético: a seleção dos genitores e os mecanismos de herança dos caracteres a serem selecionados. Para a escolha de genitores, o conhecimento da variabilidade genética existente é decisivo.

Estudos sobre diversidade genética têm sido de grande importância para fins de melhoramento genético e para avaliar o impacto da atividade humana na biodiversidade. Em nível populacional, estes estudos permitem compreender os mecanismos micro e macro evolutivos, que agem sobre a diversificação das espécies e a forma em que essas populações se estruturam no tempo e no espaço e qual é o efeito das atividades humanas nessa estruturação, permitindo inferir as chances de sobrevivência ou extinção (CRUZ et al., 2011).

Desta forma, a composição genética das espécies cultivadas é de grande importância, tanto para os agricultores como para os melhoristas, permitindo a capacidade de responder a mudanças climáticas, pragas e doenças (GOVINDARA et al., 2015; DYER, 2014).

Para Bjørnstad et al. (2013), uma boa coleção de germoplasma armazenada em condições *in situ* ou *ex situ* é pré-requisito para um programa de melhoramento genético bem manejado. Desde que os países tenham interesse em gerar novos materiais para atingirem as demandas internas ou criar novos mercados fora dos seus territórios, eles precisam acessar tal diversidade, seja em seus próprios bancos de genes ou de outros países. Assim, o conhecimento da quantidade de diversidade existente permitirá uma seleção eficiente do germoplasma, ressalta Ali et al. (2008).

A avaliação da diversidade genética dentro e entre populações é realizada de forma rotineira, mediante avaliação fenotípica a partir de características morfológicas ou adaptativas e em nível bioquímico. Nas últimas décadas, análises moleculares têm permitido um estudo mais

detalhado das variações genéticas em nível do DNA (MOHAMMADI & PRASANNA, 2003). De fato, a diversidade genética de muitas espécies de plantas tem sido amplamente estudada, utilizando caracteres morfológicos e marcadores moleculares (VELDBOOM et al., 1994; GUPTA & VARSHNEY, 2000; LU et al., 2005; BLAIR et al., 2009; NELSON et al., 2016).

2.7 Marcadores moleculares

A caracterização do germoplasma baseado em marcadores moleculares têm ganhado importância devido a sua rapidez e qualidade e rapidez das informações geradas.

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética em nível de sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA). Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares que cobrem todo o genoma do organismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Suas múltiplas aplicações em estudos de genética pura e na prática do melhoramento de plantas têm sido bem referenciado por vários autores, nas últimas décadas (FERREIRA & GRATTAPLAGIA, 1998; MOHAMMADI & PRASANNA, 2003; COLLARD & MACKILL, 2008; KUMAR et al., 2009).

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares, diferenciando-se pelas características de uso, abundância no genoma, níveis de polimorfismo detectado, especificidade de locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e custo. Dentro destes, os microssatélites (*Simple Sequences Repeats*) e os SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) têm ganhado grande popularidade.

Segundo um estudo realizado por Guichoux et al. (2011), o uso dos marcadores de microssatélites tem incrementado significativamente, desde o início dos anos noventa, com múltiplas aplicações como *fingerprinting*, análise parental, mapa genético ou análises de diversidade genética, sendo este tipo de marcador molecular um dos marcadores mais populares em estudos de genética de populações. Tais marcadores foram descritos inicialmente em humanos por Litt & Luty (1989) e correspondem a sequências curtas de nucleotídeos repetidas em tandem. As regiões genômicas são amplificadas por meio de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando um par de *primers* específicos.

Apresentam elevado nível de polimorfismo, herança codominante, são multialélicos com cobertura adequada do genoma e altamente reproduzíveis. São de fácil uso, pois não requerem grandes quantidades de ADN, nem de marcação radioativa (KUMAR et al., 2009).

Para a produção de híbridos, especialmente em milho e sorgo, os marcadores de DNA têm sido utilizados para a formação de grupos heteróticos, que possam ser utilizados para explorar a heterose (vigor híbrido). O desenvolvimento de linhagens puras, para seu uso na produção de híbridos superiores, é um procedimento que consome muito tempo, além de ser de elevado custo (COLLARD & MACKILL, 2008). Igualmente, a caracterização molecular de variedades de polinização (VPA) aberta tem sido de grande importância no melhoramento de germoplasma de milho, com o fim de acessar a estrutura e diversidade genética, uma vez que a natureza heterogênea destas variedades faz que possuam grandes níveis de variabilidade dentro a serem explorados (SEMAGN et al., 2014).

Na genética de populações, os marcadores moleculares são ferramentas poderosas para a análise da diversidade dentro de espécies e para avaliar as relações entre indivíduos e populações (MOHAMMADI & PRASANNA, 2003; CHARCOSSET & MOREAU, 2004; POLEGRI & NEGRI, 2010; GOVINDARAJ et al., 2015).

No cultivo de cereais, os marcadores moleculares oferecem a possibilidade de acelerar os programas de melhoramento, oferecendo grandes abordagens para melhorar as estratégias de seleção. As aplicações destes marcadores no estudo genético de cereais têm sido diversas, incluindo: a) Acesso à variabilidade genética e caracterização de germoplasma; b) *fingerprinting* de genótipos; c) estimativa de distâncias genéticas entre populações, linhagens e materiais de cultivo; d) detecção de QTL (Qualitative Trait Loci); e) seleção assistida por marcadores e; f) identificação de sequências de genes de interesse, etc. (KORZUN, 2002).

No Brasil, o uso de marcadores moleculares tem conquistado crescente importância como ferramenta de apoio aos programas de melhoramento genético de milho pipoca, principalmente para quantificar a diversidade genética de genótipos superiores e a análise da estrutura de populações promissoras para sua inclusão em programas intrapopulacionais e desenvolvimento de híbridos (PENA et al., 2016; CARVALHO et al., 2013; ELOI et al., 2012; LEAL et al., 2010; SILVA et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar a diversidade e a estrutura genética de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca conservadas *on farm* por agricultores de dois municípios do Extremo Oeste catarinense, com a finalidade de auxiliar a elaboração de estratégias de melhoramento genético participativo para a região.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar parâmetros populacionais a partir de dados gerados por marcadores de microssatélites, a partir de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca.
- Identificar variedades crioulas de milho pipoca com potencial genético para uso em programas de melhoramento genético intrapopulacional.
- Verificar a existência de grupos populacionais divergentes, que sugerem potencial para o desenvolvimento de populações compostas, híbridos intervarietais e programas de melhoramento interpopulacional.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

O estudo foi realizado para dez populações de variedades crioulas de milho pipoca procedentes de Anchieta e Guaraciaba, pertencentes ao grupo morfológico de pipocas predominantemente brancas. As variedades do presente estudo compõem parte da coleção nuclear formada por 147 acessos do Banco de Germoplasma supervisionado pelo Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade (NEABio) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os critérios usados para a escolha das dez variedades dessa pesquisa foram: quantidade de semente; porcentagem de germinação; período de tempo em que a variedade está com a mesma família ou na mesma propriedade; origem da semente; características de uso e preferências associadas a conservação das variedades, segundo as categorias estabelecidas por Costa et al. (2016). Com base nesses critérios, foram eleitas as populações de milho pipoca com quantidade de sementes superiores a 200 unidades; porcentagem de germinação acima de 60%; tempo de cultivo pela mesma família ou na mesma propriedade superiores a 2 anos; origem da semente por herança de família, parentes ou vizinhos; e indicações de usos e preferências dentro das categorias Gastronômica (GAST) e Cultural (CULT), em razão de terem sido as mais citadas pelos agricultores. Para a categoria Gastronômicas foram incluídas as subcategorias Maciez (MAZ), Sabor (SAB), Branca (BRA), Crocante (CRO), Pé de moleque (PEMQ), Sequinha (SEQ), Sem casca (NASC), Capacidade de expansão (CE) e Pequena (PEQ) e as sub-subcategorias Volume (VOL), Estoura bem (ESTB). Para a categoria Cultural (CULT), foram consideradas as subcategorias Tradição (TRAD), Lazer (LAZ) e Valor afetivo (AFE).

Dados suplementares sobre a identificação da variedade e sobre os aspectos morfológicos, adaptativos e agronômicos estão na Tabela 1, enquanto dados sobre o manejo fitotécnico e as estratégias de seleção e melhoramento conduzidos pelos agricultores estão descritos na Tabela 2. Ambas as tabelas apresentam informações obtidas a partir do mesmo banco de dados gerado pelo Censo da Diversidade 2011/2012

Todas as demais informações sobre as variedades crioulas de milho pipoca usadas na discussão dos dados do presente estudo foram

obtidas a partir do banco de dados gerado pelo Censo de Diversidade, realizado pelo NEABio da UFSC, nos municípios de Anchieta e Guaraciaba de 2011 a 2012, bem como pelos dados do Diagnóstico da Diversidade obtidos pelo mesmo grupo e municípios, em 2012 e 2013. Dentro do contexto do presente estudo, essas informações têm a finalidade de auxiliar na interpretação dos dados de diversidade, bem como de compreender possíveis processos de erosão e estruturação genética das populações estudadas.

Neste estudo, faz-se referência ao termo população para indicar cada variedade local ou crioula conservada por uma família de agricultor, em sua unidade de produção familiar. Assim, esse termo é usado para diferenciar as variedades quanto a sua origem geográfica, bem como quanto às diferenças genéticas visualmente distinguíveis para características fenotípicas. Cada população foi registrada como um acesso dentro da coleção de sementes conservada no banco de germoplasma supervisionado pelo NEABio.

Tabela 1. Características de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca de Anchieta e Guaraciaba, Santa Catarina

IDV	NV*	C/M*	TG*	CG*	TP*	TF*	Or*	UP*	CXP (mL.g ⁻¹)**	PRO (kg.ha ⁻¹)**	AACPD**
574A	Branca Pontuda	Liso Baixo/GBA	Pontudo	Branco	8	8	Vizinho	-	44.2	0.657	165,7 T
283A	Pipoca	Guataparalto/GBA	Redondo	Branco	7	80	Herança	ESTB, SAB, NCAS	27.5	0.987	208,8 P
319E	Branca	Guataparema/GBA	Pontudo	Branco	-	-	-	-	29.1	0.921	145,8 P
66A	Branca Pontuda	B. da Traíra/GBA	Pontudo	Branco	3	3	Parente	MAZ, NCAS,VOL	29.6	1.259	194,8 T
2360A	Branca	Cordilheira/ANC	Pontudo	Branco	-	-	-	-	29.6	0.783	92,2 T
884B	Branca Graúda	Sao João/GBA	Pontudo	Branco	2	2	Parente	MAZ, SAB	32.6	0.72	173,8 T
244A	Pipoca Branca	F. da Cunha/GBA	Muito Pontudo	Branco	15	20	Herança	SAB, MAZ, TRAD	25.7	0.913	203,6 T
857C	Branca	São Cristóvão/GBA	Pontudo	Branco	3	3	Vizinho	VOL, ESTB	35.3	0.671	96,8 T
880A	Branca	São Domingos/GBA	Muito Pontudo	Branco	6	6	Parente	-	36.5	1.215	114,3 T
977A	Pipoca	São Vicente/GBA	Pontudo	Branco	37	37	Amigo	-	37.1	0.655	74,7 T

IDV: Código de identificação das populações variedades crioulas no banco de germoplasma da UFSC. *Dados obtidos a partir do banco de dados do Censo da Diversidade 2011-2012: Nome da variedade (NV), Comunidade/Município (C/M), Tipo de grão (TG), Cor de grão (CG), Tempo na propriedade em anos (TP), Tempo na família em anos (TF), Origem (Or), Usos e preferências (UP), sendo que UP contém as classes: Estoura bem (ESTB), Maciez (MAZ), Sem casca (NASC), Sabor (SAB), Tradição (TRAD) Volume (VOL). **Dados obtidos a partir das avaliações de Gonçalves (2016): Capacidade de expansão sem peso dos piruás (CXP), Produtividade (PRO), Área abaixo da curva de progresso da doença- % severidade- (AACPD), Ciclo tardio (T), Ciclo precoce (P).

Tabela 2. Estratégias de manejo e seleção praticadas pelos agricultores de Anchieta e Guaraciaba para a conservação de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca.

IDV	CP*	CD*	TI*	PS*	PPS*	QSG*	QP/E*	QP*	AP*	CS*
574A	Nenhum	Nenhum	Temporal	Sim	Espiga	5 Espigas	5 Plantas	0.2	140	Tipo de grão (com ponta) uniformidade de grãos
283A	Nenhum	Nenhum	Temporal	Sim	Espiga	12 Kg	Mistura de espigas	0.5	200	grãos sadios, espiga granada; não castiçado
319E	Nenhum	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
66A	Nenhum	Nenhum	-	Não	-	-	-	0.7	100	-
2360A	Nenhum	Nenhum	-	-	-	-	-	-	-	-
884B	Nenhum	Nenhum	Temporal	Sim	Espiga	8 espigas	8 espigas	0.5	1600	Espigas mais puras, uniformidade de grãos
244A	Nenhum	Nenhum	Temporal	Sim	Planta e Espiga	250 gramas	Mistura de espigas	0.02	100	Acamamento, plantas sadias, empalhamento
857C	Nenhum	Nenhum	Ambos	Sim	Espiga	10 espigas	10 espigas	0.2	400	Tamanho de grão (maior), tamanho de espiga
880A	Nenhum	Nenhum	Temporal	Sim	Espiga	400g	Todas as plantas	0.4	100	Tipo de grão (com ponta)
977A	Nenhum	Nenhum	Espacial	Sim	Espiga	3 Espigas	3 Espigas	0.08	20	Direção de fileiras de grãos

IDV: Código de identificação das populações de variedades crioulas no banco de germoplasma da UFSC. *Dados obtidos a partir do banco de dados do Censo da Diversidade 2011-2012 e Diagnóstico da Diversidade 2012-2013: Controle de pragas (CP), Controle de doenças (CD), Tipo de isolamento (TI), Prática de seleção (PS), Parte de planta selecionada (PPS), Quantidade de sementes guardadas (QSG), Quantidade de plantas ou espigas (QP/E), Quanto planta em kg (QP), Área plantada em m² (AP), Características observadas para a seleção (CS).

4.2 Coleta e armazenamento do tecido foliar

Uma quantidade de 50 plantas por população foi semeada em bandejas de isopor de 200 células, em condições protegidas de telado. Aproximadamente 15 dias após a emergência das plantas, foi coletado separadamente o tecido foliar de 50 plantas de cada população, para a extração de DNA e subsequente amplificação com marcadores moleculares de microssatélites. Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Agrobiodiversidade (LAGROBio) da UFSC.

4.3 Extração de DNA

O procedimento de extração de DNA foi baseado na metodologia CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), descrita por Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações. Foram analisadas 500 plantas em um total de dez variedades crioulas, perfazendo 50 indivíduos por população.

A extração foi realizada em microtubos de 1,5 ml, contendo aproximadamente 100 mg de tecido vegetal, previamente pulverizado em nitrogênio líquido e 700 µl de buffer CTAB (Tris-HCL 1M pH 7,5; NaCl 5M; EDTA 0,5M pH 8,0; CTAB 1% e 140 mM de β-mercaptoetanol), previamente preparado. Os microtubos foram agitados para homogeneização do conteúdo e incubados em banho-maria a 65°C por 60 min, agitando o microtubo suavemente a cada 10 min. Após este período, os microtubos foram retirados do banho-maria e resfriados por 5 min. A seguir, foram adicionados 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (CIA 24:1), seguido de inversão suave dos microtubos durante 10 min, antes de serem centrifugados por 10 minutos a 6.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo, a partir do qual foi iniciada uma segunda extração com CIA. Após esta segunda extração, foi adicionado ao sobrenadante 1 ml de etanol absoluto. O conteúdo foi invertido suavemente e deixado em repouso por 24 horas a -20°C, para garantir uma maior precipitação do DNA. Terminado o período de precipitação, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm, antes do descarte do sobrenadante. O pélete foi lavado com 1 ml de etanol 70% (gelado), por meio da inversão dos microtubos por 5 minutos e subsequente descarte da solução de lavagem. Esta última etapa de lavagem foi repetida pela adição de 1 ml de etanol absoluto,

seguida de inversão dos microtubos por 3 min. O etanol absoluto foi descartado e o pélete foi deixado a temperatura ambiente para sua secagem. A ressuspensão do pélete foi efetuada com 50 µl de água Milli-Q ultrapura autoclavada. Um período de incubação de duas horas foi conduzido pela adição de 1,5 µl RNase. Após este período, o DNA foi armazenado a -20°C até o seu uso nas reações de polimerase em cadeia (PCR) com seis locos marcadores de microssatélites.

4.4 Verificação de qualidade e quantificação de DNA

O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose para a verificação da sua qualidade. As amostras foram corridas em um gel de 1.5 % por 30 min a 80 volts com tampão TAE 1X (0,04M Tris-Acetato e 0,001 M EDTA). A quantificação de cada amostra foi feita por espectrofotometria Nano Drop (ThermoScientific).

4.5 Otimização de primers microssatélites

Para a escolha dos primers polimórficos, foram avaliados previamente um total de 70 locos de microssatélites, identificados através do site Maize DB, acessado em www.maizegdb.org. Alguns primers também foram escolhidos por terem sido utilizados previamente em estudos de diversidade genética com milho pipoca, muitos deles apresentando detecção de vários alelos e padrões de amplificação legíveis.

Para a identificação da temperatura de amplificação de cada par de primer, foi calculada a T melting (temperatura de anelamento) de cada um deles mediante a fórmula: $T_m = 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C})$ (NEWTON & GRAHAM, 1997). Por conseguinte, baseado nas informações das temperaturas, foram estabelecidos testes de gradiente da reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de selecionar as condições térmicas ótimas de anelamento para cada primer.

Os testes de gradiente foram feitos num termociclador T100 ThermalCycler (BioRad) e as condições ajustadas para um volume final de 10 µl, contendo 25 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada dNTP, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1X reaction buffer (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9, and 0.1% Triton X-100) e concentrações variáveis dos primers (0.165, 0.33 e 0.4 µM), como última etapa da otimização da PCR. Para todos os testes, utilizou-se um programa de PCR com condições de ciclagem e temperaturas de

desnaturação e extensão padrão. Na Tabela 3, são enumerados os passos do programa de PCR utilizado no presente estudo.

Tabela 3. Condições do programa PCR utilizado para a amplificação dos locos microssatélites.

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	Desnaturação inicial	95 °C	5 min	
2	Desnaturação	94 °C	30 seg	
3	Anelamento	Específica a cada primer	45 seg	38
4	Extensão	72 °C	30 seg	
5	Extensão Final	72 °C	7 min	

Os primers que apresentaram amplificação foram submetidos a testes de polimorfismo para verificar sua reprodutibilidade, em um total de oito amostras aleatórias de DNA das diferentes variedades em estudo.

Os produtos de amplificação foram separados mediante eletroforese em gel de agarose a 3% (AMRESCO's Agarose RA™), com uma voltagem constante de 80 volts por um período de 1,5 horas. A visualização do gel foi feita através do Fotodocumentador Fusion FX6 XT (VilberLourmat).

4.6 Análise da diversidade

Para a análise da diversidade, foram selecionados os primers bngl669, phi090, umc1071, phi053, umc1653 e bngl565 por terem mostrado reprodutibilidade e bons padrões de amplificação nos testes de polimorfismo, além de estarem amplamente dispersos nos diferentes cromossomos do milho. As condições de amplificação foram as mesmas já descritas.

As imagens dos géis foram capturadas com ajuda do Foto documentador Fusion FX6 XT (VilberLourmat) e analisadas mediante o software FUSION- CAPT. O tamanho aproximado dos alelos foi calculado com base no “DNA Ladder” 100 pb (Promega) e os dados

foram expressos numa matriz de Excel. Os alelos produzidos pelo conjunto dos seis locos numerados sequencialmente foram nomeados com base na posição relativa apresentada no gel.

4.7 Análises estatísticas

Existem diferentes parâmetros genéticos que ajudam a quantificar a variabilidade genética e descrever a forma como ela se estrutura entre e dentro de populações, permitindo fazer inferências de como manipulá-la.

Para cada loco estudado, foram quantificados o número de alelos amplificados em cada população, bem como as frequências absoluta e relativa de genótipos heterozigóticos e homozigóticos. A estrutura populacional das variedades crioulas de milho pipoca foi inferida a partir das médias estimadas para esses dois últimos parâmetros, com base nos dados gerados pelos referidos locos de microssatélites.

As estimativas das frequências alélicas, estatísticas descritivas, distância genética, análise de agrupamento e análise de variância molecular (AMOVA) foram efetuadas pelo programa GeneA1Ex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). O índice de fixação e as demais estatísticas F de Wriqht foram geradas pelo programa Fstat (GOUDET, 2001). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado manualmente.

4.7.1 Cálculo de frequências alélicas (p)

A frequência alélica para cada loco e cada população, foi estimada com base no número de ocorrência das diferentes classes genotípicas mediante a fórmula:

$$p = \sum_{i=1}^a \frac{nii}{N} + \frac{1}{2} \sum_{(i \neq j)=1}^a \frac{nij}{N}$$

onde *nii* e *nij* são o número de ocorrência do genótipo homozigótico e heterozigótico, respectivamente, e *N* o número de amostras.

4.7.2 Cálculo de Estatísticas descritivas

Alguns parâmetros descritivos de diversidade dentro de populações foram considerados. Estas informações são de muita

utilidade para inferir como se encontra distribuída a variabilidade genética dentro de uma população.

A percentagem de locos polimórficos (P%) foi estimada por: $(P / T) \times 100$, onde P é o número de locos polimórficos e T o número total de locos analisados. Um loco foi considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum era menor do que 99%.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) (BOTSTEIN et al., 1980) foi estimado mediante a fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1}^a \sum_{(i \neq j)} p_i^2 p_j^2$$

onde p_i e p_j são as frequências alélicas do i -ésimo e o j -ésimo alelo, respectivamente, num loco com a alelos e numa determinada população.

O número total de alelos por loco (A) foi determinado pela contagem direta de todos os alelos presentes na população e, assim, o número médio de alelos por loco (Na) resultou da média aritmética do número de alelos produzido pelo loco em cada população.

O número efetivo de alelos por loco polimórfico (N_e) (KIMURA & CROW, 1964) foi estimado por: $N_e = 1/(1-H_e)$, onde N_e é um estimador do número de alelos que são igualmente frequentes em uma população ideal e H_e é a heterozigosidade esperada.

A Heterozigosidade média observada (\hat{H}_o) foi estimada com base na média dos locos de microssatélites amostrados (l) para o quociente estabelecido entre o número de heterozigotos (p_{ij}) e o número de indivíduos amostrados (N), assim: $\hat{H}_o = (\sum p_{ij}/N) / l$, sendo $\sum p_{ij}$ o somatório dos genótipos heterozigóticos observados.

A Diversidade Genética (Heterozigosidade média esperada) (\hat{H}_e) (NEI, 1978) para um loco, também chamada de diversidade genética, é dada por: $\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2$, sendo p_i a frequência alélica estimada do i -ésimo alelo. Para múltiplos locos, a heterozigosidade média de uma população é dada por: $\hat{H}_e = (\sum H_{i(j)}) / l$. A mesma é gerada a partir média aritmética dos valores das heterozigosidades sobre todos os locos, sendo que $H_{i(j)}$ é a estimativa de heterozigosidade no j -ésimo loco e L o número de locos de microssatélites amostrados. Esta é a heterozigosidade que se espera existir em condições de acasalamento ao acaso, ou seja, panmixia.

A partir da relação entre as frequências de heterozigotos (\hat{H}_o) e (\hat{H}_e), foi calculado o Índice de fixação (f) ou coeficiente de endogamia (WRIGHT, 1951, 1965). Este parâmetro mede a probabilidade de um indivíduo dentro da população ser um homozigoto autozigótico por ascendência. Assim, f é dado mediante: $f = (\hat{H}_e - \hat{H}_o) / \hat{H}_e$

A significância dos valores encontrados foi obtida pelo programa Fstat (GOUDET, 2001) pela construção de um intervalo de confiança de 95%.

4.7.3 Medidas de estrutura populacional

Para populações subdivididas, as Estatísticas F de Wright (1951, 1965, 1978) são parâmetros amplamente utilizados, com a finalidade de estimar o grau de diferenciação genética. Elas são geradas a partir da partição do índice de fixação.

Estas estatísticas foram estimadas pelo programa Fstat (GOUDET, 2001), tendo como base o método descrito por Weir & Cockerham (1984). Para gerá-las, devem ser estimados os coeficientes de heterozigosidade descritos por Nei (1977): Heterozigosidade esperada com base no total de todas as populações (H_T), Heterozigosidade esperada total entre populações (\hat{H}_{ET}) e Heterozigosidade observada total das populações (\hat{H}_{OT}).

As estatísticas F de Wright são descritas a continuação:

F_{IS} (ou f): mede a fixação a nível de indivíduos, ou seja, o grau de redução da heterozigosidade, devido a probabilidade de dois alelos de um loco presente no mesmo indivíduo serem idênticos por descendência. É visto como uma medida de endogamia dentro das populações.

$$F_{IS} = f = (\hat{H}_{ET} - \hat{H}_{OT}) / \hat{H}_{ET}$$

F_{ST} (ou θ): é uma medida de diferenciação genética entre as subpopulações, pois representa a probabilidade de dois indivíduos pertencentes a populações diferentes possuírem um alelo idêntico por descendência.

$$F_{ST} = (H_T - \hat{H}_{ET}) / H_T$$

F_{IT} (ou F): é o coeficiente de endogamia total que mede os desvios das frequências genotípicas do conjunto das populações amostradas, com respeito ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a cruzamentos não ao acaso.

$$F_{IT} = (H_T - \hat{H}_{OT}) / H_T$$

A significância das estatísticas F foram obtidas por meio de 1000 reamostragens geradas pelo Fstat (GOUDET, 2001), resultando em um intervalo de confiança significativo de 95%.

4.7.4 Análises de Distância Genética

A partir das frequências alélicas, podem ser quantificadas as distâncias genéticas existentes entre um conjunto de indivíduos.

Neste estudo, utilizou-se a distância genética D de Nei (1972), a qual é dada pelo logaritmo neperiano da Identidade genética (I): $D = -\ln(I)$, sendo que a identidade genética é dada por:

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$$

Sendo que I = Identidade genética entre x e y , $J_{xy} = \sum x_i y_i$, $J_x = \sum x_i^2$, $J_y = \sum y_i^2$. Assim, x_i e y_i são as frequências respectivas do i -ésimo alelo considerando as populações x e y . Nei (1972) caracterizou a identidade genética (I) como a probabilidade de um determinado alelo de um loco, tomado aleatoriamente em duas populações distintas, fosse idêntico em relação à probabilidade de dois alelos no mesmo loco, tomados aleatoriamente em cada população, também fossem idênticos. Portanto, se duas populações quaisquer exibem os mesmos alelos em frequências idênticas, $J_x = J_y = J_{xy} = 1$. No caso de que elas não exibam alelos em comum, tanto J_{xy} quanto I são iguais a zero.

4.7.5 Análise de Agrupamento

A partir da matriz de distância elaborada a partir das estimativas de D , foi gerado um dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages). Para esta análise foi utilizado o programa PAST® versão 3.12 (HAMMER et al., 2001).

4.7.6 Análise molecular de variância – AMOVA.

A metodologia AMOVA (EXCOFFIER et al., 1992) é utilizada para calcular a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações. Esta técnica estuda a diferenciação populacional diretamente a partir de dados moleculares e testa a hipótese a respeito de

tal diferenciação. A AMOVA baseia-se, assim, na análise da matriz de distância entre todos os genótipos, utilizando um esquema de variância hierarquizada. As estatísticas obtidas pela AMOVA, estatísticas Φ , refletem, portanto, a correlação da diversidade dos genótipos em diferentes níveis de subdivisão.

Para o cálculo da AMOVA foi utilizado o GeneAEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). A significância estatística de cada componente da variância foi avaliada em base a 999 permutações dos dados.

5. RESULTADOS

5.1 Otimização de primers microssatélites

A identificação de primers de microssatélites de milho para a realização do presente estudo foi baseada na reprodutibilidade da amplificação e presença de alelos polimórficos. Inicialmente, foi necessária uma primeira fase de avaliação de um total de 70 primers de microssatélites distribuídos pelos dez cromossomos do milho. Foram realizados testes de gradiente para a determinação da melhor temperatura de anelamento para cada primer.

O protocolo de amplificação descrito na Tabela 3 demonstrou ser eficiente para a amplificação de 32 primers de microssatélites, nos diferentes cromossomos do milho. Os restantes 38 primers não amplificaram ou apresentaram ampliações muito inespecíficas.

Uma vez selecionada a temperatura ótima de amplificação, foram realizados testes adicionais para identificar a melhor concentração de cada primer a ser utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Apresenta-se na Tabela 4 a lista de 32 primers microssatélites em relação a sua condição ótima de temperatura de amplificação e concentração.

A amplificação de um primer pode ser influenciada por diversos fatores que interferem no seu anelamento e sua extensão. Assim, diferenças na síntese dos primers, condições de amplificação utilizadas, diferenças dos reagentes e manejo dos mesmos por parte do operador, podem interferir (ROUX, 1995; LORENZ, 2011). Desta forma, apesar das recomendações quanto a temperatura de anelamento feita pelo fabricante dos primers e mesmo a existência de estudos prévios registrados na literatura para alguns deles, muitas vezes, encontram-se dificuldades na amplificação, motivo pelo qual se faz necessário desenvolver condições de amplificação próprias às condições de cada laboratório. Neste estudo, foi possível padronizar as temperaturas de anelamento para a maioria dos primers, sendo nove, seis, nove e quatro primers amplificados pelas temperaturas de anelamento de 60 °C, 63°C, 65 °C e 67 °C, respectivamente. Os demais quatro primers apresentaram temperaturas de anelamento similares. A unificação de temperaturas para diferentes primers facilita as atividades laboratoriais, otimizando o uso dos equipamentos e acelerando a obtenção de resultados, sobretudo

quando se trabalha com grande quantidade de amostras. Na Figura 1, encontram-se alguns dos primers otimizados por Testes de Gradiente de PCR. O primer umc 2046 foi um dos 38 primers que apresentou ampliações não satisfatórias.

Tabela 4. Primers microssatélites de milho otimizados para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Microssatélite	Braço	Concentração	Temperatura de anelamento
phi015	8.08	0.165 µM	65
bngl669	8.03	0.165 µM	67
bngl565	5.02	0.165 µM	50
phi084	10.04	0.33 µM	65
phi097	1.01	0.33 µM	59
phi057	7.01	0.33 µM	61
umc1241	7	0.33 µM	67
umc2059	6.08	0.33 µM	67
umc1071	1.01	0.33 µM	63
phi053	3.05	0.33 µM	63
umc1653	6.07	0.33 µM	60
umc1336	10.03	0.33 µM	65
phi062	10.04	0.33 µM	63
phi090	2.08	0.33 µM	67
phi063	10.02	0.33 µM	63
umc1125	7.04	0.33 µM	65
umc2046	4.09	0.33 µM	65
bngl572	7.03	0.33 µM	60
phi014	8.04	0.33 µM	65
bngl504	1.11	0.33 µM	65
bngl257	1.07	0.33 µM	63
bngl602	3.04	0.33 µM	65
bngl236	10.06	0.4 µM	63
phi075	6	0.4 µM	65
umc2246	2	0.4 µM	60
umc1065	2.06	0.4 µM	60
umc2262	3.04	0.4 µM	60
umc2281	4.03	0.4 µM	60
umc2292	5	0.4 µM	60
umc1415	8.03	0.4 µM	51
umc2401	8.05	0.4 µM	60
umc1075	8.01	0.4 µM	60

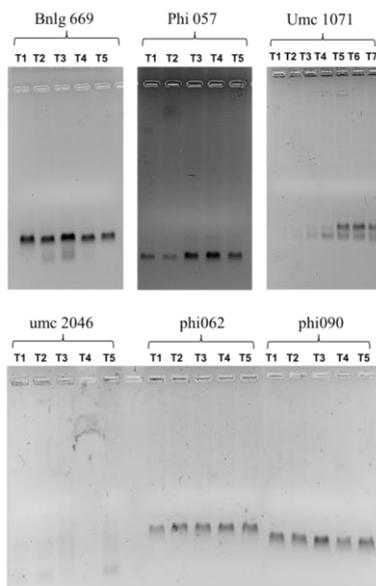


Figura 1. Provas de Gradiente PCR para otimização de primers microsatélites. Eletroforeses em gel de agarose (3%), 80 volts, 1.5 horas de duração, Amostra de DNA utilizado número 311. As faixas de temperaturas dos gradientes foram estimadas a partir do cálculo da T Melting de cada par de primer.

5.2 Análise da diversidade

Após o processo de otimização da reação de amplificação dos primers, foram utilizados seis locos de microsatélites polimórficos para a realização do presente estudo. A descrição dos primers, temperaturas de amplificação e alelos detectados encontram-se na Tabela 5.

Para os seis locos de microsatélites, localizados nos cromossomos 1, 2, 3, 5, 6 e 8 do milho, foram identificados um total de 18 alelos, considerando uma amostra de DNA de 500 plantas, obtidas de dez populações de milho pipoca. Dentre todos os primers, bnlg669 foi aquele que apresentou o maior número de alelos, também se destacando por ser facilmente amplificável e por apresentar padrões consistentes de bandas a baixas concentrações de primers. Isso indica um bom potencial deste primer para ser usado em estudos de diversidade genética.

Tabela 5. Sequências dos primers microssatélites utilizados para o estudo da diversidade genética de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca, sequência repetitiva em tandem, posição nos cromossomos, temperatura de anelamento e número e tamanhos de amplificação dos alelos detectados.

Locos SSR	Sequência de nucleotídeos	Sequência repetida	Posição	Braço	Temperatura anelamento	N° alelos achados nesse estudo	Tamanho (pb)	N° alelos achados em outros estudos
umc1071								
Forward	AGGAAGACACGAGAGACACCGTAG	(TACGA)5	1.01	S	63	3	80-140	3 - 5
Reverse	GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTATT							
phi090								
Forward	CTACCTATCCAAGCGATGGGGA	ATATC	2.08	L	67	2	170-260	1 - 11
Reverse	CGTGCAAATAATCCCCGTGGGA							
phi053								
Forward	CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC	ATAC	3.05	L	63	2	180-215	3 - 6
Reverse	AACCCAACGTACTCCGGCAG							
bngl565								
Forward	TAAGAACGACGAACGGTAACTG	(CT)21	5.02	S	50	3	80-200	6 - 8
Reverse	GCTCACTGCACGCCAACAC							
umc1653								
Forward	GAGACATGGCAGACTCACTGACA	(GAAA)24	6.07	L	60	3	100-160	5- 10
Reverse	GCCGCCACGTACATCTATC							
bngl669								
Forward	GCACGCACCAGCAGTCGGCAGT	(GA)20	8.03	L	67	5	110-300	2 - 7
Reverse	CGGCCTAGTGGGCATGGAGCCT							

O número de alelos encontrado para este conjunto de populações está de acordo com a quantidade de alelos encontrada em outros estudos de diversidade genética de milho com estes mesmos primers de microssatélites, incluindo linhagens endogâmicas, progênes superiores, variedades de polinização aberta, híbridos e *landraces*, embora estes números sejam inferiores ao maior número de alelos achado em outros estudos. Tal fato pode ser decorrente da baixa diversidade genética presente nestes materiais, embora não se pode desconsiderar que estes resultados tenham a ver com a utilização de técnicas menos sensíveis de separação e identificação de fragmentos.

Na Tabela 6, encontram-se as frequências alélicas de cada um dos alelos identificados nas diferentes populações de milho pipoca avaliadas neste estudo. A maior frequência média total foi estimada para o alelo 3 do loco *bngl565* ($p = 0,526$). A amplitude de variação das frequências alélicas deste alelo entre as dez populações foi de 0,296 (244A) a 0,816 (977A). As populações 283A, 884B e 244A apresentaram um perfil monomórfico para os locos de microssatélites *phi 090* e *phi 053*. Dos 18 alelos identificados neste estudo, somente 5 apresentaram frequências inferiores a 0,25, sendo que as menores frequências totais médias foram apresentadas pelo alelo 2 do loco *bngl 565* (0,071) e pelo alelo 5 (0,087) do loco *bnlg 669*. Apesar dos valores estimados para esses dois locos de microssatélites terem sido similares, destaca-se como particularidade do alelo 2 do loco *bnlg 565* a sua presença em nove das dez populações estudadas, alcançando uma frequência máxima de 0,150 para a população 880A. Por outro lado, o alelo 5 do loco *bnlg 669* apareceu somente nas populações 283A e 884B a uma frequência de 0,45 para 283A e 0,42 para 884B, indicando uma leve tendência à fixação do referido alelo nestas populações. Além deste alelo, não foram identificados outros alelos exclusivos no restante das populações.

Embora as frequências alélicas médias dos alelos para cada um dos locos de microssatélites não apresentem distribuições drásticas, pode se observar que dentro de algumas populações existem alelos com frequência muito baixa, tal como é o caso do alelo 2 do primer *umc 1071* na população 857C, o alelo 1 do primer *phi 090* na população 244A, dentre outros, cujas frequências foram muito inferiores àquelas apresentadas no resto das populações.

Tabela 6. Frequências alélicas de seis locos de microssatélites para dez populações de variedades crioulas de milho pipoca de Anchieta e Guaraciaba, no Extremo Oeste de Santa Catarina.

Locos	Alelo	Variedades Crioulas										Total
		574A	283A	319E	66A	2360A	884B	244A	857C	880A	977A	
umc1071	N	49	50	50	50	49	50	48	50	50	50	
	1	0,429	0,260	0,320	0,530	0,500	0,410	0,135	0,450	0,510	0,370	0,391
	2	0,204	0,550	0,510	0,210	0,143	0,340	0,250	0,020	0,220	0,210	0,266
	3	0,367	0,190	0,170	0,260	0,357	0,250	0,615	0,530	0,270	0,420	0,343
phi090	N	49	50	50	50	50	50	49	50	48	49	
	1	0,296	1,000	0,840	0,380	0,270	0,680	0,051	0,710	0,313	0,571	0,511
	2	0,704	0,000	0,160	0,620	0,730	0,320	0,949	0,290	0,688	0,429	0,489
phi053	N	48	49	46	50	50	50	49	50	48	50	
	1	0,365	0,439	0,848	0,490	0,270	0,000	1,000	0,080	0,510	0,780	0,478
	2	0,635	0,561	0,152	0,510	0,730	1,000	0,000	0,920	0,490	0,220	0,522
bnlg565	N	49	50	50	50	50	50	49	50	50	49	
	1	0,459	0,340	0,440	0,460	0,320	0,590	0,571	0,270	0,450	0,122	0,402
	2	0,010	0,070	0,080	0,100	0,000	0,040	0,133	0,070	0,150	0,061	0,071
	3	0,531	0,590	0,480	0,440	0,680	0,370	0,296	0,660	0,400	0,816	0,526
umc1653	N	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
	1	0,480	0,500	0,450	0,550	0,490	0,290	0,510	0,470	0,500	0,500	0,474
	2	0,060	0,000	0,330	0,420	0,350	0,230	0,160	0,350	0,240	0,210	0,235
	3	0,460	0,500	0,220	0,030	0,160	0,480	0,330	0,180	0,260	0,290	0,291
bnlg669	N	48	50	47	49	50	50	49	49	49	50	
	1	0,427	0,050	0,085	0,112	0,110	0,190	0,265	0,245	0,480	0,820	0,278
	2	0,156	0,000	0,426	0,296	0,020	0,000	0,184	0,000	0,000	0,000	0,108
	3	0,417	0,110	0,447	0,153	0,060	0,280	0,408	0,173	0,153	0,170	0,237
	4	0,000	0,390	0,043	0,439	0,810	0,110	0,143	0,582	0,367	0,010	0,289
	5	0,000	0,450	0,000	0,000	0,000	0,420	0,000	0,000	0,000	0,000	0,087

O valor PIC médio para os seis locos estudados foi de 0,514, sendo o primer bnlg669 aquele que apresentou o maior valor (0,72) e os primers phi 090 e phi 053, os menores valores (0,37) (Tabela 7). Considerando o valor médio total, o grau de polimorfismo detectado pelos seis locos de microssatélites pode ser considerado moderado.

Tabela 7. Frequências alélicas (p) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) estimados para seis locos de microssatélites e com base nos totais de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina.

Locos	$p(A1)$	$p(A2)$	$p(A3)$	$p(A4)$	$p(A5)$	PIC
umc1071	0,391	0,266	0,343			0,584
phi090	0,511	0,489				0,375
phi053	0,478	0,522				0,375
bnlg565	0,402	0,071	0,526			0,462
umc1653	0,474	0,235	0,291			0,563
bnlg669	0,278	0,108	0,237	0,289	0,087	0,724
Media						0,514

Na Tabela 8, estão apresentadas as estimativas de diversidade para cada loco estudado. O número médio de alelos por loco nas dez populações de milho pipoca crioulo avaliadas foi de 2,68, sendo que os locos bnlg 669 e umc 1071 aportaram os maiores números médios de alelos por loco. O menor número efetivo de alelos foi estimado para o loco phi 053 ($Ne = 1,55$) e o maior, pelo loco bnlg 669 ($Ne = 2,56$) com uma média de 2,14 alelos efetivos nos seis locos estudados. Apesar do primer bnlg 669 ter apresentado o maior número médio de alelos por loco ($Na = 3,60$), favorecido pela detecção de cinco alelos, este loco foi aquele que apresentou a maior redução proporcional de Ne em relação ao Na , uma vez que a baixa frequência do quinto alelo nas populações resultou na redução da estimativa de Ne para esse loco (Tabela 7). Da mesma forma, o primer bnlgl 565 também possui um alelo de baixa frequência causando maior nível de discrepância entre seus valores Na e Ne . Alelos de baixa frequências contribuem muito pouco ao número efetivo de alelos, pois não se encontram distribuídos igualmente no conjunto das populações.

A heterozigidade média observada de todos os locos apresentou um valor inferior ($\hat{H}_o = 0,46$) em relação à heterozigidade média esperada ($\hat{H}_e = 0,60$). Porém, dois locos registraram valores de heterozigidade observada superiores aos valores de heterozigidade esperada (umc 1071 e umc 1653).

Os seis locos revelaram uma fixação média de 0,23, sendo que os menores índices de fixação foram estimados para os locos umc 1071 ($f = -0,10$) e umc 1653 ($f = -0,28$), como reflexo dos seus maiores valores de heterozigidade observada. Pelo contrário, o loco bngl 669 teve a maior fixação de alelos no conjunto das populações ($f = 0,59$).

Tabela 8. Índices de diversidade genética estimados para seis locos de microssatélites e com base nos dados totais de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina.

Locos	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	\hat{H}_o	\hat{H}_e	<i>f</i>
umc1071	496,0	3,00	2,54	0,729	0,659	-0,104
phi090	495,0	1,90	1,59	0,271	0,500	0,459
phi053	490,0	1,80	1,55	0,235	0,499	0,530
bngl565	497,0	2,90	2,10	0,412	0,557	0,259
umc1653	500,0	2,90	2,49	0,816	0,636	-0,283
bngl669	491,0	3,60	2,56	0,308	0,764	0,598
Média¹	495,0	2,68	2,14	0,462	0,603	0,234

¹Médias estimadas com base nos seis locos de microssatélites de milho. Tamanho da amostra (*N*), Porcentagem de locos polimórficos (*P99%*), Número médio de alelos por loco (*Na*), Número efetivo de alelos (*Ne*), Heterozigidade média observada (\hat{H}_o), Heterozigidade média esperada (\hat{H}_e), Índice de Fixação ou Coeficiente de endogamia (*f*).

Com relação às populações individuais, as estimativas da heterozigidade média observada (\hat{H}_o) de seis locos oscilaram de 0,32 a 0,60, com uma média total de 0,46 (Tabela 9). As maiores frequências relativas de genótipos heterozigóticos foram registradas para as populações 880A ($H_o = 0,60$), 574A ($H_o = 0,57$) e 66A ($H_o = 0,57$); as menores foram apresentadas pelas populações 244A ($H_o = 0,32$), 857C ($H_o = 0,38$) e 319E ($H_o = 0,38$). Cinco populações apresentaram valores de alelos efetivos acima da média total ($Ne = 2,14$), destacando-se as populações 880A, 66A e 884B para essa variável. Todas as populações contêm locos com elevados percentuais de polimorfismo, sendo o valor mínimo estimado de 83%. O índice de fixação médio estimado para

cada população foi relativamente baixo, assim como na média das populações ($f = 0,067$). Quatro populações (574A, 66A, 2360A e 880A) apresentaram valores de f negativos e o resto delas apresentaram estimativas positivas de f , variando de 0,002 (977A) até 0,230 (319E e 244A). Metade das populações (283A, 319E, 884B, 244A, 857C) apresentaram desvios significativos das frequências genóticas em relação ao equilíbrio de Hardy-Weimberg, enquanto que as cinco restantes (574A, 66A, 2360A, 880A, 977A) não se desviam significativamente (Tabela 9).

Tabela 9. Índices de diversidade genética para dez populações de variedades crioulas de milho pipoca baseado em dados médios de seis locos de microssatélites.

População	N	(P99%)	N_a	N_e	\hat{H}_o	\hat{H}_e	f
574A	48,83	100,00	2,67	2,21	0,579	0,539	-0,075 ^{ns}
283A	49,83	83,33	2,50	2,05	0,414	0,563	0,106 ^s
319E	48,83	100,00	2,83	2,16	0,384	0,498	0,230 ^s
66A	49,83	100,00	2,83	2,35	0,571	0,567	-0,007 ^{ns}
2360A	49,83	100,00	2,67	1,94	0,470	0,466	-0,010 ^{ns}
884B	50,00	83,33	2,67	2,29	0,427	0,494	0,137 ^s
244A	49,00	83,00	2,67	2,10	0,328	0,424	0,230 ^s
857C	49,83	100,00	2,67	1,98	0,382	0,464	0,179 ^s
880A	49,17	100,00	2,67	2,37	0,606	0,572	-0,059 ^{ns}
977A	49,67	100,00	2,67	1,97	0,456	0,456	0,002 ^{ns}
Média¹	49,48	95,00	2,68	2,14	0,462	0,494	0,067
S²	0,11	2,55%	0,09	0,08	0,037	0,022	0,055

¹Médias estimadas com base nas dez populações de variedades crioulas de milho pipoca. S²: Desvio padrão. Tamanho médio da amostra (N), Porcentagem de locos polimórficos (P99%), Número médio de alelos por loco (N_a), Número efetivo de alelos (N_e), Heterozigosidade média observada (\hat{H}_o), Heterozigosidade media esperada (\hat{H}_e), Índice de Fixação ou Coeficiente de endogamia (f). Nível de significância estatística: Significativo (s), Não significativo (ns).

As estatísticas F de Wright para cada loco estão apresentadas na Tabela 10. Em termos de estrutura genética, o estudo mostrou um nível

de diferenciação moderadamente elevado e significativo entre as populações ($F_{ST} = 0,19$) com valores de pouca diferenciação registrados para os locos umc 1653 ($F_{ST} = 0,067$), bngl 565 ($F_{ST} = 0,074$) e umc 1071 ($F_{ST}=0,086$), até valores de elevada diferenciação registrados para o loco phi 053 ($F_{ST} = 0,398$).

Dentro das populações, o índice de fixação foi relativamente baixo ($F_{IS} = 0,06$) e com ausência de significância estatística, basicamente pelo excesso de heterozigotos registrados nos locos umc 1071 e umc 1653. Este parâmetro (F_{IS}) está relacionado aos desvios da panmixia, decorrentes do sistema reprodutivo. Diferentemente, o aumento de homozigose do F_{ST} está relacionado com a estruturação espacial (subdivisão em variedades), forçando acasalamentos entre indivíduos que estão mais aparentados por causa de uma amostragem de tamanho finito e, nesse sentido, não se relaciona com o sistema reprodutivo. Já o índice de fixação total (F_{IT}) engloba os efeitos da endogamia produzida pela subdivisão e pelo sistema de reprodução. Este parâmetro apresentou estimativa média relativamente maior ($F_{IT}= 0,24$), porém não significativo com relação ao conjunto das populações.

Tabela 10. Estatísticas F de Wright para os seis locos de microssatélites analisados nas dez populações de variedades crioulas de milho pipoca de Anchieta e Guaraciaba, Extremo Oeste de Santa Catarina.

Locos	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
umc1071	-0.095	0.086	-0.198
phi090	0.477	0.332	0.216
phi053	0.548	0.398	0.250
bngl565	0.265	0.074	0.206
umc1653	-0.275	0.067	-0.366
bngl669	0.608	0.255	0.473
Média¹	0.249^{ns}	0.195^s	0.066^{ns}
S²	0,161	0,055	0,153

¹Médias estimadas com base nas dez populações de variedades crioulas de milho pipoca. S²: Desvio padrão. F_{IS} : Índice médio de fixação dentro de populações, F_{IT} : Índice de fixação total e F_{ST} : Índice de fixação entre populações. Nível de significância estatística: Significativo (s), Não significativo (ns).

Os níveis de divergência entre as populações (Tabela 11) foram variáveis, sendo que os pares de populações 880A e 66A ($F_{ST} = 0,021$) e

880A e 577A ($F_{ST} = 0,027$) foram aquelas que apresentaram as menores divergências e as maiores foram encontradas para os pares de populações 244A e 283A ($F_{ST} = 0,272$), 244A e 884B ($F_{ST} = 0,270$) e 857C e 244A ($F_{ST} = 0,267$). Este coeficiente reflete a proporção da divergência genética total, variando de 0. (sem diferenciação) até 1,0 (completa diferenciação). Neste último caso, as populações fixaram diferentes alelos.

Tabela 11. Estimativas de F_{ST} par a par entre as dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina.

Pop	574A	283A	319E	66A	2360A	884B	244A	857C	880A	977A
574A	0,000									
283A	0,138	0,000								
319E	0,122	0,093	0,000							
66A	0,049	0,135	0,090	0,000						
2360A	0,071	0,162	0,184	0,037	0,000					
884B	0,088	0,106	0,163	0,113	0,125	0,000				
244A	0,116	0,272	0,151	0,126	0,184	0,270	0,000			
857C	0,094	0,117	0,165	0,078	0,054	0,065	0,267	0,000		
880A	0,027	0,134	0,109	0,021	0,047	0,109	0,104	0,087	0,000	
977A	0,083	0,149	0,096	0,100	0,150	0,189	0,144	0,143	0,069	0,000

Os coeficientes de Distância Genética de Nei (1972) para as dez populações estão apresentados na Tabela 12. A representação gráfica destas distâncias está indicada no dendrograma da Figura 2. Com uma linha de corte em 0,51, observa-se a formação de quatro grupos (G). O primeiro grupo está formado pela população 244A, o segundo pelas populações 66A, 880A, 574A e 977A; o terceiro apresenta três populações, ou seja, 2360A, 857C e 884B; por último, duas populações constituem o quarto grupo, sendo elas 283A e 319E.

Tabela 12. Matriz de Distância Genética de Nei para as dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina.

Pop	574A	283A	319E	66A	2360A	884B	244A	857C	880A	977A
574A	0,000									
283A	0,356	0,000								
319E	0,304	0,215	0,000							
66A	0,155	0,336	0,221	0,000						
2360A	0,208	0,371	0,505	0,078	0,000					
884B	0,184	0,171	0,414	0,283	0,290	0,000				
244A	0,213	0,687	0,319	0,251	0,415	0,709	0,000			
857C	0,227	0,238	0,439	0,164	0,097	0,160	0,672	0,000		
880A	0,076	0,335	0,298	0,065	0,105	0,253	0,191	0,187	0,000	
977A	0,175	0,346	0,238	0,272	0,362	0,469	0,275	0,324	0,150	0,000

Estes resultados indicam a existência de grupos heteróticos claramente definidos, entre as dez populações crioulas de milho pipoca. As populações 66A e 880A são as mais similares, enquanto as populações 884B e 244A possui a maior distância genética entre elas.

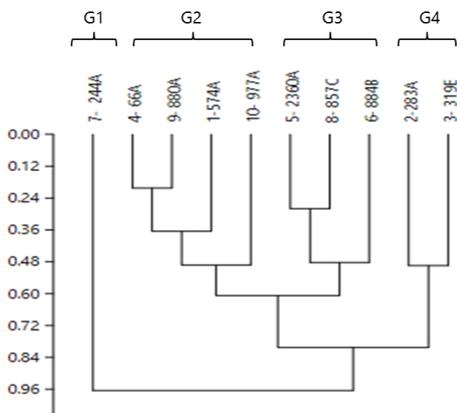


Figura 2. Distância genética entre dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina. O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA (coeficiente de correlação cofenética = 0,742).

A análise de variância molecular das dez populações de milho pipoca revelou que a maior parte da variação (74%) se encontra dentro dos indivíduos. Percentagens menores foram encontradas entre indivíduos (7%) e populações (19%).

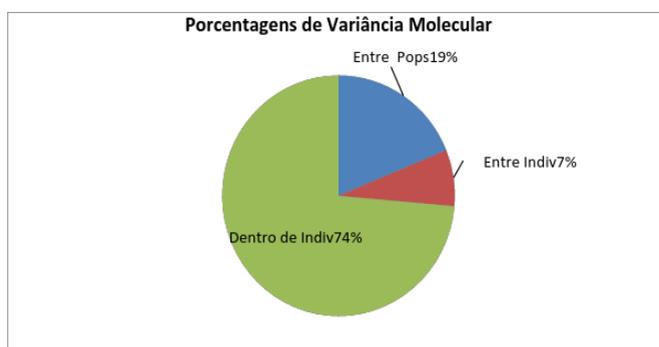


Figura 3. Análise de Variância Molecular (AMOVA) de dez populações de variedades crioulas de milho pipoca do Extremo Oeste de Santa Catarina, utilizando o software GeneALEX.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste estudo, foram analisadas dez populações de milho pipoca conservadas por agricultores do Extremo Oeste catarinense. Estas populações representam uma pequena parte do total de variedades de milho crioulo conservado *on farm* nesta região.

Atualmente, no Brasil e na região de estudo existem poucas pesquisas com variedades crioulas de milho pipoca. A maior parte dos estudos sobre as bases genéticas são realizados para materiais elites, conservados em bancos de germoplasma de instituições de ensino e pesquisa do país, que atualmente possuem programas de melhoramento genético de milho pipoca. Assim, há uma lacuna de informação com respeito aos recursos genéticos de milho pipoca conservados *on farm*, o que dificulta a comparação entre estudos da mesma natureza. Apesar disto, os parâmetros de diversidade estimados neste trabalho podem ser discutidos com base em estudos prévios da mesma espécie, sem focar exclusivamente na natureza do germoplasma.

Considerando os valores de alelos e número médio de alelos por loco obtidos neste estudo ($A = 18$, $N_a = 2,68$), estes valores são levemente menores àquelas obtidas em outros estudos realizados com variedades de milho melhoradas ou em processo de melhoramento. Por outro lado, os valores estimados no presente trabalho apresentaram maior diferença em relação a outros estudos realizados com variedades crioulas (Tabela 13).

Valores mais próximos da variável número médio de alelos por loco (N_a) do presente estudo foram obtidos por Fernandez et al. (2015) e Pena et al. (2016). No estudo realizado por Fernandez et al. (2015), os autores analisaram 48 linhagens endogâmicas de milho comum pertencentes ao programa de Melhoramento Genético da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC), enquanto que Pena et al. (2016) avaliaram um total de 47 genótipos superiores de milho pipoca, dentre eles o híbrido IAC 125 e as variedades UENF14 e BRS Ângela. Embora, os valores de N_a tenham sido similares aos do presente trabalho, ambos os estudos identificaram um maior número de alelos totais para os genótipos avaliados, em razão do maior número de populações (44) e locos de microssatélites estudados (25). Valores superiores foram obtidos por Carvalho et al. (2013), que estimaram uma média de 4,06 alelos por loco, em oito variedades de polinização aberta

de milho pipoca, utilizando 15 locos de microssatélites, e por Eloit et al. (2012), que reportaram 3,7 alelos por loco, igualmente avaliando oito genótipos superiores de milho pipoca com 15 locos de microssatélites. O número total de alelos obtidos por Carvalho et al. (2013) e Eloit et al. (2012) foi similar, ou seja, 61 e 57, respectivamente. Um número maior de alelos em genótipos superiores de milho pipoca foi reportado por Silva et al. (2015) por meio de um aumento considerável da quantidade de locos de microssatélites e do número de genótipos avaliados.

Tabela 13. Estudos de diversidade genética referenciados na literatura com variedades de milho.

Autor	Tipo de milho	Tipo de Germoplasma	Pop	NP/P	NL	A	Na	AAP
Nesse estudo	Pipoca	Variedades crioulas	10	50	6	18	2,68	2 a 5
Pena et al., 2016	Pipoca	Progênies e variedades elites	47	-	25	72	2,88	2 a 5
Fernandez et al., 2015	Comum	Linhagens endogâmicas	48	10	44	124	2,8	2 a 5
Silva et al., 2015	Pipoca	Híbridos, VPA	31	15	30	127	4,23	2 a 8
Carvalho et al., 2013	Pipoca	VPA	8	15	15	61	4,06	3 a 5
Bracco et al., 2013	Pipoca e farináceos	Raças nativas	25	467*	15	192	12,8	5 a 26
Eloi et al., 2012	Pipoca	Híbridos, VPA, Genótipos de Argentina e Chile	8	9	15	57	3,7	2 a 5
Bracco et al., 2009	Pipoca	Variedades crioulas	6	131*	10	65	4,78	3 a 12
Wu et al., 2004	Pipoca	Variedades crioulas	14		43	232	5,4	2 a 13

Pop: Quantidade de Genótipos ou Populações avaliadas, NP/P: Número de plantas analisadas por população, NL SSR: Número de locos de microssatélites, A: Número total de alelos identificados, Na: Número médio de alelos por loco, AAP: Amplitude de alelos entre populações, VPA: variedades de Polinização Aberta. * Número total de plantas analisadas.

Outros estudos com variedades crioulas e raças nativas têm reportado valores muito maiores de variabilidade. Bracco et al. (2009, 2013) detectaram 65 alelos, com uma média de 4,78 alelos por loco, utilizando dez locos de microssatélites para avaliar seis populações de

milho pipoca crioulo, mantidas em assentamentos indígenas, na Província de Misiones ao Nordeste da Argentina. Estes mesmos autores também avaliaram um conjunto de 25 raças nativas de milho pipoca e milho farináceo (BRACCO et al., 2013), utilizando 15 locos de microssatélites, reportando 192 alelos e uma média de 12,8 alelos por loco polimórfico. Valores de A e Na muito superiores são reflexo da elevada variabilidade genética dos materiais estudados e dos primers utilizados. Por sua vez, Wu et al. (2004) avaliaram 14 populações de milho pipoca crioulo da província de Yunnan, na China, por meio de uma maior quantidade de locos de microssatélites (43), dando como resultado a detecção de 232 alelos e um valor médio de 5,4 alelos por loco.

No presente estudo, foram avaliados um total de 500 indivíduos em dez populações (50 por população), sendo este um número muito superior ao registrado por outras pesquisas (Tabela 13). Uma amostragem maior de genótipos combinada à natureza crioula das populações suporia a obtenção de valores maiores de variabilidade de alelos de microssatélites. Porém, o número médio de alelos por loco do presente estudo ($Na = 2,68$) foi inferior ao registrado em outras pesquisas realizadas tanto com base na análise de genótipos superiores quanto como de materiais crioulos de outras regiões. Portanto, a maior quantidade de indivíduos avaliados nessa pesquisa parece não ser um fator determinante para obtenção de uma maior riqueza alélica.

Neste sentido, outras pesquisas com milho pipoca de natureza crioula também encontraram baixos níveis de diversidade. Bracco et al. (2013), por exemplo, destacaram que apesar de terem obtido elevados níveis de variabilidade com locos de microssatélites, no conjunto de materiais estudados, os valores de diversidade genética detectados no grupo de milhos pipoca “reventadores” corresponderam à metade dos valores obtidos para as populações de milhos farináceos. Os autores atribuíram esse resultado à existência de processos de erosão e deriva genética mais significativos para o grupo das pipocas, somado a processos de seleção mais estritos por parte dos agricultores. E por último, consideraram a possibilidade de que os milhos “reventadores” pudessem ter níveis de variabilidade ancestral muito mais baixos, em comparação às populações de milhos farináceos. Dados similares foram obtidos no México por Reif et al. (2006), que avaliaram um conjunto de 25 raças de milho com marcadores de microssatélites. Esses autores

constatarem menores níveis de diversidade para as raças de milho pipoca.

Considerando que provavelmente os milhos do tipo pipoca possam estar sujeitos a menores níveis de variabilidade decorrente de alguns processos evolutivos, seria recomendável para futuras pesquisas aumentar o número de locos de microssatélites avaliados e utilizar métodos de detecção de polimorfismos mais sensíveis que ajudariam a descartar ou, no caso, corroborar os apontamentos já descritos.

No contexto dos locos de microssatélites, um parâmetro que fornece uma estimativa do poder discriminativo do primer é o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), pois considera tanto o número de alelos por loco, como suas frequências relativas (CRUZ et al., 2011) e, nesse sentido, está diretamente relacionado com a variabilidade da região de DNA dos genótipos avaliados (PENA et al., 2016). Os valores PIC são inferiores aos detectados para a heterozigosidade e podem variar entre 0 a 1, indicando maior nível de polimorfismo ou variação quando o valor é mais próximo a 1 (CRUZ et al., 2011; MATHIAS et al., 2007). Os valores PIC obtidos neste estudo oscilaram dentro de uma amplitude que variou de 0,37 a 0,72, com um valor médio de 0,51, similar ao reportado por Silva et al. (2015) (PIC = 0,53), para 31 genótipos superiores de milho pipoca. Igualmente, Terra et al. (2011), avaliando cinco populações de milho doce, milho comum e teosinto, estimaram um valor PIC médio de 0,52, para 25 locos de microssatélites analisados.

Dado que o valor PIC depende do número de alelos encontrados e de suas frequências relativas, é possível identificar valores PIC em outros estudos iguais ou diferentes para um mesmo loco de microssatélite. Alguns dos locos avaliados neste estudo reportaram valores similares de PIC, sobretudo em trabalho realizados no Brasil para genótipos superiores de milho pipoca e milho comum. Esse foi o caso do loco marcador umc 1071, que apresentou um total de 3 alelos e um valor PIC de 0,58, com base nas dez populações crioulas de milho pipoca analisadas no presente trabalho. Estes valores são similares aos reportados por Fernândes et al. (2015) (3 alelos, PIC 0,56), avaliando 48 linhagens endogâmicas de milho comum. Por sua vez Silva et al. (2015) identificaram 4 alelos para este loco, com um valor PIC levemente maior (0,64), a partir da análise de 31 genótipos superiores de milho pipoca.

Por outro lado, o loco marcador bngl 669 apresentou maior poder discriminativo para as populações de milho pipoca (5 alelos, PIC= 0,72), em razão da elevada heterogeneidade das frequências alélicas. Este

mesmo loco de microssatélite também foi analisado por Fernandes et al. (2015) e, neste estudo, os autores obtiveram um número inferior de variabilidade (2 alelos, PIC= 0,21).

O primer phi 090 apresenta valores variáveis de alelos e PIC. No presente trabalho, foram identificados 2 alelos e valor PIC de 0,37, enquanto Senior et al. (1998) identificaram 3 alelos e PIC de 0,33, estudando 94 linhagens endogâmicas de milho da EE.UU. Um valor PIC igual ao obtido por Senior et al. (1998), também foi encontrado por Wasala & Prasanna (2012), avaliando 48 milhos crioulos da Índia, embora o número de alelos tenha sido muito superior (11 alelos, PIC= 0,33). Em um terceiro estudo realizado por Gonzales-Castro et al. (2013), para 20 raças nativas de diferentes regiões do México, os autores identificaram para este loco um total de 7 alelos e um PIC de 0,27 para esse loco.

O elevado poder discriminativo de um loco de microssatélite nem sempre está relacionado com elevados valores PIC, pois o mais importante para discriminar genótipos é de fato a composição genética da população em estudo (WARBURTON et al., 2002). Warburton et al. (2002) ainda destacaram que não é possível prever qual loco marcador será o mais discriminativo, baseando-se somente neste valor.

Em geral, levando em consideração o valor PIC médio apresentado pelos seis locos de microssatélites avaliados (0,51), as populações crioulas de milho pipoca analisadas no presente estudo revelaram um perfil de população constituída por genótipos heterozigóticos e, principalmente, heterogênea quanto às frequências alélicas, independentemente do baixo número de alelos obtido por loco, em relação a outros materiais crioulos de milho.

Os valores médios das heterozigosidades observada e esperada estimados a partir das dez populações ($H_o = 0,46$; $H_e = 0,49$) foram similares, podendo indicar a princípio, uma tendência do conjunto populacional a panmixia. Porém, deve-se considerar que individualmente algumas populações possuem desvios significativos dos valores H_o e H_e , pelo qual a existência de níveis gerais de equilíbrio não pode ser afirmada completamente.

Considerando os valores de diversidade individuais, as populações 880A, 574A e 66A apresentaram relevante potencial para o desenvolvimento de programas de seleção intrapopulacional, visando o melhoramento da população *per se*, inicialmente devido às elevadas

estimativas de heteroziguidade observada obtidas no presente estudo ($H_o = 0,60$; $0,57$; e $0,57$, respectivamente). Além disso, essas mesmas populações apresentaram valores médios promissores para rendimento de grãos (880A, 66A), resistência à doença fúngica causada por *Exserohilum turcicum* (880A) e capacidade de expansão excluindo os piruás (880A, 574A), tal como foi evidenciado nos estudos realizados por Gonçalves (2016).

Tais características de diversidade, apresentadas pelo presente estudo, e de potencial genético apresentada pelas populações 880A, 574A e 66A, nos estudos de Gonçalves (2016), apontam-nas como materiais promissores para o desenvolvimento de programa de seleção recorrente intrapopulacional. Particularmente, a população 880A diferencia-se das demais por possuir boas médias expressivas para as duas características de maior interesse no melhoramento genético de milho pipoca, isto é, a capacidade de expansão e produtividade (GONÇALVES, 2016). Apesar disso, esta população possui grãos pontudos, característica pouco atrativa para fins comerciais. No entanto, a população 283A, mesmo possuindo estimativas de heteroziguidade observada menores, apresenta formato de grão redondo e boas médias para capacidade de expansão e produtividade. Assim sendo, a população 283A é uma alternativa atrativa para ser inserida dentro de um programa de melhoramento formal para futura comercialização e recomendação como cultivar.

Valores positivos e negativos do índice de fixação (f) foram estimados ao nível de locos e populações, revelando deficiência e excesso de genótipos heterozigóticos, respectivamente. Ao nível de locos, o índice de fixação negativo, apresentado pelos locos umc 1071 e umc 1653, deveu-se ao excesso de heterozigotos observados nas populações ($H_o = 0,72$ e $H_o = 0,81$). Possivelmente, as regiões amplificadas pelos locos umc 1071 e umc 1653 são menos afetadas pelos processos de seleção e deriva genética. Entretanto, o restante dos locos apresentou valores H_o menores o que representa maiores níveis de fixação de alelos visualizado nos maiores índices de f .

Os valores de heteroziguidade observada ($H_o = 0,46$) e heteroziguidade esperada ($H_e = 0,49$) do presente trabalho são semelhantes aos obtidos por Bracco et al. (2009) para o conjunto de seis populações de milho pipoca nativo. Estes autores constataram níveis de diversidade compatíveis aos esperados na condição de equilíbrio ($H_o = 0,33$ e $H_e = 0,37$). Eles ainda destacaram que dois dos dez locos de microssatélites avaliados no seu estudo apresentaram fixação total na condição homozigótica em duas populações. O anterior, concorda com

os dados obtidos no presente estudo, uma vez que os primers phi 090 e phi 053 apresentaram fixação em três populações de milho pipoca.

Em contraste, estudos realizados com genótipos superiores de milho pipoca (SILVA et al., 2015; CARVALHO et al., 2013) e milho comum (REIF et al., 2004) têm mostrado deficiência de heterozigotos. Uma vez que as populações avaliadas neste estudo são de pequeno tamanho, pois os agricultores usam e renovam suas sementes após cada safra a partir de grãos advindos de um pequeno número de espigas, se esperaria a existência de maiores proporções de homozigosidade no conjunto populacional. Porém, analisando as populações individualmente, pode-se observar uma maior ou menor presença de heterozigotos em algumas delas em relação ao que seria esperado em condições de equilíbrio. Diferenças no manejo e seleção exercidos pelos agricultores poderia estar afetando mais ou menos o grau de variabilidade das populações.

Entretanto, há algumas hipóteses que tentam explicar o favorecimento do genótipo heterozigótico em populações de pequeno tamanho, mas até o momento, não há modelos teóricos contundentes para prever a riqueza alélica numa população com seleção direcionada ao longo das gerações (CABALLERO & GARCIA-DORADO, 2013), fazendo que a dinâmica da diversidade em populações pequenas ainda seja pouco entendida (FU, 2015). Este último autor atribui o favorecimento do genótipo heterozigótico à existência de alelos favoráveis dentro da população de pequeno tamanho. Segundo o autor, a heterozigosidade esperada deste alelo pode ser mantida ou incrementada ao longo das gerações, dependendo primordialmente do tipo de alelo, seu grau de dominância e sua frequência inicial.

Existência de mutações adaptativas também tem sido apresentada como uma possível causa destes processos. Para Sellis et al. (2011), em diploides frequentemente acontecem mutações adaptativas, muitas delas apresentando vantagem dos heterozigotos. Neste caso, se a forma heterozigótica for melhor do que o mutante homozigótico, esta mutação não teria tendência à fixação e, ao contrário, manteria uma forma intermediária a partir do estabelecimento de um balanço das frequências genotípicas.

É possível que os locos avaliados neste estudo não estejam sendo afetados pelos processos de seleção. Para evitar qualquer erro de amostragem em próximos estudos, seria recomendável avaliar um maior

número de locos e conhecer se os presentes resultados respondem ou não a um padrão de variabilidade.

O baixo valor médio de fixação observado para o conjunto das populações ($f = 0,067$) revela a ausência de processos endogâmicos fortes nestes materiais. Resultados similares aos do presente estudo foram obtidos por Bracco et al. (2013) ao analisar cinco populações de milho pipoca do Nordeste da Argentina, cujas estimativas variaram de 0,008 até 0,28. Por sua vez, Pineda et al. (2013), utilizando 20 primers de microssatélites, detectaram valores de fixação moderados ($f = 0,17$) para um conjunto de 28 populações de milho crioulo do Estado do Sinaloa, no México. Dentro destas populações, foi avaliado um acesso de milho pipoca conhecido como “reventador”. Este acesso apresentou um valor He de 0,58 e um índice de fixação (f) de 0,54.

No presente estudo, foram encontrados níveis consideráveis de diferenciação entre as dez populações crioulas de milho pipoca avaliadas ($F_{ST} = 0,19$; Tabela 10). Segundo Wright (1978), valores menores a 0,05 representam muito pouca diferenciação; valores entre 0,5 - 0,15 refletem pouca diferenciação; valores com amplitude de variação entre 0,15 a 0,25 possuem elevados níveis de diferenciação; e valores acima de 0,25 são considerados como níveis de diferenciação muito elevada. O mais elevado nível de diferenciação entre populações foi revelado pelos primers phi 053 e phi 090 ($F_{ST} = 0,39$ e $0,33$, respectivamente), possivelmente por ter revelado maiores proporções de homozigose em várias populações. A maioria dos valores F_{ST} , estimados par a par, a partir das dez populações (Tabela 11) exibiu amplitude de variação de 0,05 até 0,18 e somente três pares de populações - 283A e 244A ($F_{ST} = 0,272$), 884B e 244A ($F_{ST} = 0,270$) e 244A e 977A ($F_{ST} = 0,267$) - apresentaram valores levemente superiores a 0,25, indicando a maior divergência entre si para os seis primers de microssatélites analisados.

A realização de estudos sobre divergência genética é fundamental para a definição de estratégias de melhoramento genético, uma vez que os cruzamentos feitos entre genitores geneticamente divergentes são os mais convenientes para produzir maior efeito heterótico e a obtenção de maior variabilidade genética em gerações segregantes (RAO et al., 1981). Por outro lado, cruzamentos feitos entre genitores muito relacionados podem causar baixo vigor por conta da pouca complementaridade, pois tendem a compartilhar muitos genes ou alelos em comum, prejudicando a heterozigosidade (GHADERI et al., 1884).

No seu estudo de caracterização de germoplasma local, Gonçalves (2016) identificou as populações 574A e 880A como

materiais promissores para o desenvolvimento de populações compostas, pois além de apresentarem potencial individual quanto a produtividade de grãos (PRO) e capacidade de expansão sem o peso dos piruás (CXP) também possibilitam a combinação complementar para um conjunto de características de interesse em variedades de milho pipoca. Esse estudo efetuado com base em avaliações fenotípicas diverge dos resultados do presente estudo, que mostrou uma baixa diferenciação entre essas populações ($F_{ST} = 0,027$), considerando os seis locos de microssatélites analisados.

As dez populações crioulas analisadas no presente estudo apresentaram boas médias na pesquisa realizada por Gonçalves (2106) para, pelo menos, um dos três caracteres de interesse em milho pipoca, ou seja, produtividade de grãos (PRO), capacidade de expansão sem o peso dos piruás (CXP) e resistência a *Exserohilum turcicum* (RE). Neste caso, o fator divergência poderia ser o componente diferencial para a definição de um programa de cruzamentos intervarietais entre variedades portadoras de características complementares. O esquema dialélico de cruzamentos pode oferecer ao melhorista informações genéticas úteis para a seleção de progenitores para hibridação, assim como na natureza dos efeitos genéticos que estão envolvidos na determinação dos caracteres (CRUZ & REGAZZI, 2001). Tais estudos permitem direcionar a formação de compostos para uso em programas de melhoramento intrapopulacional, híbridos intervarietais ou a escolha de populações promissoras para serem utilizadas num esquema de seleção recorrente recíproca. Apesar do valor médio de divergência total das dez populações refletir um nível levemente elevado de diferenciação ($F_{ST} = 0,19$), é importante destacar que a maior parte dos valores de divergência par a par estimados no presente estudo (Tabela 11) oscilam na faixa de 0,05 a 0,15, revelando menores níveis de diferenciação entre esses pares de populações. Ponderando o critério de potencial fenotípico elevado para os caracteres PRO, CXP e RE (GONÇALVES, 2016) de cada grupo, aliado aos níveis de divergência estimados no presente estudo as populações 880A, 244A, 2360A, 319E, 884B, 283A, 857C e 574A apresentam-se como materiais interessantes a serem incluídos em esquema de cruzamentos dialélicos. As análises dos cruzamentos em esquema dialélico a partir das populações indicadas permitirão identificar as melhores combinações para a formação de compostos e

híbridos intervarietais para as características de interesse, assim como a definição de grupos heteróticos.

A escolha de populações para a formação de compostos deve basear-se na capacidade geral combinação (CGC), que depende dos efeitos aditivos (SCAPIM et al., 2002) intrínsecos à cada população. A capacidade específica de combinação, por sua vez, está associada à heterose explorada na formação de híbridos intervarietais ou de linhagens e, por isso, depende das interações alélicas e não alélicas estabelecidas a partir de cruzamentos entre entidades genéticas contrastantes (CRUZ & REGAZZI, 2001).

Os resultados de agrupamento UPGMA (Figura 2) obtido neste estudo não parecem guardar relação com o agrupamento baseado em características morfológicas feito por Gonçalves (2016), com exceção das populações 574A e 66A, que coincidem num mesmo grupo, em ambos os estudos. Porém, tanto os dados fenotípicos quanto os dados moleculares mostram a formação de grupos bem definidos entre as populações.

Os resultados da análise AMOVA revelaram que 74% da variância genética encontra-se dentro do total de indivíduos avaliados, 7% entre plantas e 19% entre as populações. Resultados similares foram reportados por Silva (2015) utilizando marcadores de microssatélites em híbridos e variedades de polinização aberta de milho pipoca, referenciando que 60% da variância esteve dentro de populações e 40% entre elas. Também os estudos feitos por Vigouroux et al. (2008), para um total de 310 raças nativas do continente americano, revelaram maior variação genética dentro de indivíduos (68,4%), enquanto que a variação entre raças e entre indivíduos dentro de raças foi de 7,6% e 24%, respectivamente. Concomitantemente, outros autores (BRACCO et al., 2013; SINGODE & BODDUPALLI, 2010; HOXHA et al., 2004) têm observado resultados similares.

Nybom & Bartish (2000) destacam que a quantidade de variação genética existente numa população e a forma na qual ela se distribui dentro ou entre populações depende de varios fatores como o sistema de reprodução, a dispersão das sementes e o rango de distribuição geográfica. Assim, estes resultados de variância genética são decorrentes do sistema reprodutivo desta espécie, uma vez que o milho possui polinização cruzada o que resulta em maiores níveis de diversidade alélica dentro do que entre populações (HAMRICK & GODT, 1997). Por outro lado, os níveis menores de variação entre indivíduos e populações poderiam responder à existência de moderados níveis de fluxo gênico entre populações do mesmo tipo, ou a presença

de uma rede de troca de sementes uma vez que esta é uma prática comum dentro do sistema tradicional dos agricultores na busca de experimentar com novos materiais genéticos (LOUETTE et al., 1997; THOMAS et al., 2011).

7. CONCLUSÕES

As informações de diversidade genética obtidas neste estudo revelam que as variedades crioulas de milho pipoca são populações estruturadas e com elevados níveis de heterozigosidade. Tais características fazem dessas variedades promissores acessos a serem incorporados em futuros programas de melhoramento genético participativo na região do Extremo Oeste catarinense.

Recomendam-se as populações 880A, 574A e 66A para o desenvolvimento de um programa de seleção recorrente intrapopulacional, uma vez que as mesmas possuem individualmente níveis elevados de variabilidade genética e bons atributos para rendimento de grão, capacidade de expansão e resistência a *Exserohilum turcicum*. Já as populações 880A, 244A, 2360A, 319E, 884B, 283A, 857C e 574A são promissoras para a realização de estudos dialélicos, pois combinam divergência e performance.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M. L., RAJEWSKI, J. F., BAENZIGER, P. S., GILL, K. S., ESKRIDGE, K. M., & DWEIKAT, I. Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sorghum germplasm by SSR markers. **Molecular Breeding**, v. 21, n. 4, p. 497-509, 2008.

ALTIERI, M. & TOLEDO, V. M. The agroecological revolution of Latin America: rescuing nature, securing food sovereignty and empowering peasants. **The Journal of Peasant Studies**, vol. 38, n. 3, p. 587-612, 2011.

ARNHOLD, E.; SILVA, R. G.; VIANA, J. M. S. Seleção de linhagens S 5 de milho-pipoca com base em desempenho e divergência genética. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 279-283, 2010.

BERED, F.; NETO, J.F.B.; CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Revista Ciencia Rural**, Santa María, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BERED, F.; TERRA, T. D. F.; SPELLMEIER, M.; NETO, J. F. B. Genetic variation among and within sweet corn populations detected by RAPD and SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, n. 4, p.418-425, 2005.

BJØRNSTAD, Å.; TEKLE, S.; GÖRANSSON, M. “Facilitated access” to plant genetic resources: does it work?. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 7, p. 1959-1965. 2013.

BLAIR, M. W.; DÍAZ, L. M.; BUENDÍA, H. F.; DUQUE, M. C. Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 6, p. 955-972, 2009.

BOEF, WALTER SIMON DE. **Biodiversidade e agricultores: fortalecendo o manejo comunitário**. Porto Alegre: L&PM Editores, 2007. 271 p.

BORÉM ALUÍZIO.; VIEIRA GLAUCO. **Melhoramento de plantas**. 6ª Edição. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013. 523 p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BRACCO, M.; LIA V. V.; POGGIO, L.; CAMARA, J. A.; GOTTLIRB, A. M. Genetic diversity in maize landraces from indigenous settlements of Northeastern Argentina. **Genetica**, v. 135, n. 1, p. 39–49, 2009.

BRACCO, M.; LIA V. V.; POGGIO, L.; CAMARA, J. A.; GOTTLIRB, A. M. Caracterización Genética de Razas de Maíz Autóctonas de Misiones Argentina. **Revi. Cien. Tecnol.**, v. 15, n. 20, p. 52–60, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa nº 61**, de 22 de dezembro de 2011.

BRUGNERA, A.; VON PINHO, R. G.; PACHECO, C. A. P.; ALVAREZ, C. G. D. Resposta de cultivares de milho-pipoca a doses de adubação de semeadura. **Revista Ceres**, v. 50, n. 290, p. 417-429, 2003.

CABALLERO, A. & GARCÍA-DORADO, A. Allelic diversity and its implications for the rate of adaptation. **Genetics**, v. 195, n. 4, p. 1373–1384, 2013.

CANCI, I. **Relações dos sistemas informais de conhecimento no manejo da agrobiodiversidade no Oeste de Santa Catarina**. 2006. 204 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARVALHO, H. M. de. **Sementes: patrimônio do povo a serviço da humanidade** (subsídios ao debate). São Paulo: Expressão Popular, 2003. 352 p.

CARVALHO, M. S. N. D; MANGOLIN, C. A.; SCAPIM, C. A.; DA SILVA, T. A.; DA SILVA, M. D. F. P. A collection of popcorn as a reservoir of genes for the generation of lineages. **Molecular biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 300-307, 2013.

CHARCOSSET, A. & MOREAU, L. Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. **Euphytica**, v. 137, n. 1, p. 81-94, 2004.

COIMBRA, R. R.; MIRANDA, G. V.; VIANA, J. M. S.; CRUZ, C. D. Correlações entre caracteres na população de milho-pipoca DFT 1-Ribeirão. **Revista Ceres**, v. 48, p. 427-436, 2001.

COLLARD, B. C. & MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n.1491, p. 557-572, 2008.

COSTA, F. M. **Diversidade genética e distribuição geográfica: uma abordagem para a conservação on farm e ex situ e o uso sustentável dos recursos genéticos de milho do Oeste de Santa Catarina**. 2013. 212 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COSTA, F. M.; SILVA, N. C. A.; OGLIARI, J. B. Maizediversity in Southern Brazil: indication of a microcenter of *Zeamays* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, p. 1-20, 2016.

CRUZ, C.D. & REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 390p.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1ª Edição. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011. 620p.

DANDOLINI, T. S.; SCAPIM, C. A.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; MOTT, A. S.; LOPES, A. D. Genetic divergence in popcorn lines detected by microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 313-320, 2008.

DOYLE, J.J. & DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DYER, G. A.; LÓPEZ-FELDMAN, A.; YÚNEZ-NAUDE, A.; TAYLOR, J. E. Genetic erosion in maize's center of origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 39, p. 14094-14099, 2014.

ELOI, I. B. O.; MANGOLIN, C. A.; SCAPIM, C. A.; GONÇALVES, C. S.; MACHADO, M. F. P. S. Selection of high heterozygosity popcorn varieties in Brazil based on SSR markers. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 11, n. 3, p. 1851-1860, 2012.

EMPERAIRE, L. O manejo da agrobiodiversidade: o exemplo da mandioca na Amazônia. In: BENSUSAN, N. **Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade como, para quê, porquê**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília/ISA, 2002. p. 189-201.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FERNANDES, E. H.; SCHUSTER, I.; SCAPIM, C. A.; VIEIRA, E. S. N.; COAN, M. M. D. Genetic diversity in elite inbred lines of maize and its association with heterosis. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 6509-6517, 2015.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. (1998). **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN. 221p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Agricultores pequenos y familiares. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/ar588s/ar588s.pdf>. Acessado em: 14 de janeiro de 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Qué es la agricultura familiar**. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/family-farming-2014/home/what-is-family-farming/es/>. Acessado em: 13 de janeiro de 2016.

FREITAS JÚNIOR, S. D. P.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; RANGEL, R. M.; VIANA, A. P. Genetic gains in popcorn by full-

sibrecurrentselection. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2009.

FRISON, E. A.; CHERFAS, J.; HODGKIN, T. Agricultural biodiversity is essential for a sustainable improvement in food and nutrition security. **Sustainability**, v. 3, n. 1, p. 238-253, 2011.

FU, Y. B. Understanding crop genetic diversity under modern plant breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 11, p. 2131-2142, 2015.

GHADERI, A.; ADAMS, M. W.; NASSIB, A. M. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in dry edible bean and faba bean. **Crop Science**, v. 24, n. 1, p. 37-42, 1984.

GONÇALVES, G. M. B. **Caracterização e divergência genética de variedades crioulas de milho pipoca conservadas por agricultores do oeste de Santa Catarina**. 2016. 141 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GONZÁLEZ CASTRO, M. E.; PALACIOS ROJAS, N.; ESPINOZA BANDA, A.; BEDOYA SALAZAR, C. A. Diversidad genética enmaíces nativos mexicanos tropicales. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 36, n. 3, p. 239-338, 2013.

GOUDET, J. (2001). **FSTAT**, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3).

GOVINDARAJ, M; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. **Genetics research international**, vol. 2015, Article ID 431487, 14 p, 2015.

GREGOLIN, A. **Municipalização da agricultura – assistência técnica e extensão rural em Santa Catarina**. Chapecó: Grifos, 1999. 243 p.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 4, p. 591-611, 2011.

GUPTA, P. K. & VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v. 113, n. 3, p. 163-185, 2000.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST-Palaeontological **Electronica**, v. 4, n. 1, 9p, 2001.

HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. W. Allozyme diversity in cultivated crops. **Crop Science**, v. 37, n. 1, p. 26-30, 1977.

HILL, W. G. & ROBERTSON, A. The effects of inbreeding at loci with heterozygote advantage. **Genetics**, v. 60, n. 3, p. 615-628, 1968.

HOXHA, S.; SHARIFLOU, M. R.; SHARP, P. Evaluation of genetic diversity in Albanian maize using SSR markers. **Maydica**, v. 49, p. 97-104, 2004.

JÚNIOR, S. D. P. F.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; RANGEL, R. M.; VIANA, A. P. Predição de ganhos genéticos na população de milho pipoca UNB-2U sobseleção recorrente utilizando-se diferentes índices de seleção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 4, p. 803-814, 2009.

KILLEBREW, K. & WOLFF, H. (2010). Environmental impacts of agricultural technologies. **Evans School of Public Affairs**. University of Washington. <http://econ.washington.edu/files/2014/06/2010-Environmental-Impacts-of-Ag-Technologies.pdf> (accesado 25 de janeiro de 2016).

KIMURA, M. & CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, n.4, p. 725-738, 1964.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; BELING, R. R. Anuário Brasileiro do Milho 2016. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 96p.

KORZUN, V. Use of molecular markers in cereal breeding. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7, p. 811–820, 2002.

KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics**, v. 2, n.4, p. 141, 2009.

LEAL, A. A.; MANGOLIN, C. A.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SCAPIM, C. A.; MOTT, A. S.; ELOI, I. B. O.; CORDOVÉS, V.; DA SILVA, M. F. P. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 9-18, 2010.

LITT, M. & LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American journal of human genetics**, v. 44, n. 3, p. 397, 1989.

LORENZ, T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 63, p. 1-15, 2011.

LOUETTE, D.; CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. In situ conservation of maize in Mexico: genetic diversity and maize seed management in a traditional community. **Economic Botany**, v. 51, n. 1, p. 20-38, 1997.

LU, H.; REDUS, M. A.; COBURN, J. R.; RUTGER, J. N.; MCCOUCH, S. R.; TAI, T. H. Population structure and breeding patterns of 145 US rice cultivars based on SSR marker analysis. **Crop Science**, v. 45, n. 1, p. 66-76. 2005.

MACHADO, A.T.; SANTILLI, J.; MAGALHÃES, R. A **Agrobiodiversidade com enfoque agroecológico: implicações conceituais e jurídicas**. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Textos para discussão. Brasília, DF: EMBRAPA, 2008. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/documents/1035106/1047819/texto34.pdf>.
Acesso em: 29 novembro de 2015.

MATHIAS, M.; SAGREDO, B.; KALAZICH, J. Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. **Agricultura Técnica**, v. 67, n. 1, p. 3-15, 2007.

THOMAS, M.; DAWSON, J. C.; GOLDRINGER, I.; BONNEUIL, C. Seed exchanges, a key to analyze crop diversity dynamics in farmer-led on-farm conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p. 321-338. 2011.

MEIRELLES, L. R. & RUPP, L. C. D. **Biodiversidade: passado, presente e futuro da humanidade**. Brasília: MDA. Secretaria da Agricultura Familiar, 2006.

MIRANDA, D. S.; DA SILVA, R. R.; TANAMATI, A. A. C.; CESTARI, L. A.; MADRONA, G. S.; SCAPIM, M. R. Avaliação da qualidade do milho-pipoca. **Revista Tecnológica**, Edição Especial V Simpósio de Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 13-20, 2011.

MIRANDA, G. V.; DE SOUZA, L. V.; GALVÃO, J. C. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; DE MELO, A. V.; DOS SANTOS, I. C. Genetic variability and heterotic groups of Brazilian popcorn populations. **Euphytica**, v. 162, n. 3, p. 431-440, 2008.

MIRANDA, G.V.; COIMBRA, R.R.; GODOY, C.L.; SOUZA, L.V.; GUIMARÃES, L. J. M.; MELO A.V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 38, n. 6, p. 681-688, 2003.

MOHAMMADI, S. A. & PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants – salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, v. 43, n. 4, p.1235–1248, 2003.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of human genetics**, v. 41, n. 2, p. 225-233, 1977.
NEI, M. Genetic distance between populations. **American naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283-292, 1972.

NELSON, P. T.; KRAKOWSKY, M. D.; COLES, N. D.; HOLLAND, J. B.; BUBECK, D. M.; SMITH, J. S. C.; GOODMAN, M. M. Genetic Characterization of the North Carolina State University Maize Lines. **Crop Science**, v. 56, n.1, 259-275, 2016.

NEWTON, C.A. & GRAHAM, G. A. (1997). **PCR**. 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp. 192.

NYBOM, H. & BARTISH, I.V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v.3, n.2, p. 93-114. 2000.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C. Manejo e Uso de Variedades de Milho como Estratégia de Conservação em Anchieta. In: DE BOEF, W.S.; THIJSSSEN, M.H.; OGLIARI, J.B.; STHAPIT, B.R. **Biodiversidade e agricultores: fortalecendo o manejo comunitário**. Porto Alegre: L&PM Editores, p. 226- 234, 2007.

OGLIARI, J.B.; KIST, V.; CANCI, A. The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil. In: **Community Biodiversity Management - Promoting resilience and the conservation of plant genetic resources**. Ed. Earthscan from Routledge, 2013 p. 265-271.

OSÓRIO, G. T. **A dinâmica da Conservação de Variedades Crioulas no Oeste Catarinense: um Estudo a Partir de Alface e Radice em Anchieta e Guaraciaba/SC**. 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2015.

PATERNIANI, E. & MIRANDA FILHO, J.B. **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1978.

PAULA, T. O. M. D.; GONÇALVES, L. S. A.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; OLIVEIRA, É. C. D.; SILVA, V. Q. R. D.; SCAPIM, C. A.; LOPES, A. D. Magnitude of the genetic base of commercial

popcorn and in recommendation in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 289-297, 2010.

PAULA, T. O. M. D; GONÇALVES, L. S. A.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; DE OLIVEIRA, É. C.; DA SILVA, V. Q. R.; SCAPIM, C. A.; LOPES, A. D. Magnitude of the genetic base of commercial popcorn and in recommendation in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 289-297, 2010.

PEAKALL, R. & SMOUSE P. E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** 28, 2537-2539.

PENA, G. F.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; RIBEIRO, R. M.; RAMOS, H. C.; BOECHAT, M. S.; SANTOS, J. S.; MAFRA, G. S.; KAMPHORST, S. H.; DE LIMA, V. J.; VIVAS, M.; DE SOUZA, F. G. Inference of genetic diversity in popcorn S3 progenies. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 2, 2016.

PEREIRA FILHO, I. A; CRUZ, J. C; PACHECO, C. A. P; COSTA, R. V. **Milho Pipoca**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fy9zxyln02wx5ok0pvo4k359f3bo9.html>. Acessado em 30 agosto, 2016.

PINEDA-HIDALGO, K. V.; MÉNDEZ-MARROQUÍN, K. P.; ALVAREZ, E. V.; CHÁVEZ-ONTIVEROS, J.; SÁNCHEZ-PEÑA, P.; GARZÓN-TIZNADO, J. A.; VEGA- GARCÍA, M. O.; LÓPEZ-VALENZUELA, J. A. Microsatellite-based genetic diversity among accessions of maize landraces from Sinaloa in Mexico. **Hereditas**, v. 150, n. 4- 6, p. 53-59, 2013.

POLEGRI, L. & NEGRI, V. Molecular markers for promoting agrobiodiversity conservation: a case study from Italy. How cowpea landraces were saved from extinction. **Genetic resources and crop evolution**, v. 57, n. 6, p. 867-880, 2010.

POUR-ABOUGHADAREH, A.; MAHMOUDI, M.; MOGHADDAM, M.; AHMADI, J.; MEHRABI, A. A.; ALAVIKIA, S. S. Agromorphological and molecular variability in *Triticum boeoticum*

accessions from Zagros Mountains, Iran. **Genetic Resources and Crop Evolution**, p. 1-12, 2016.

RANGEL, R. M.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S.; JÚNIOR, S. D. P. F.; CANDIDO, L. S. Análise biométrica de ganhos por seleção em população de milho pipoca de quinto ciclo de seleção recorrente. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 473-481, 2011.

RANGEL, R. M.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; SCAPIM, C. A.; FREITAS JÚNIOR, S. P.; PEREIRA, M. G. Genetic parameters in parents and hybrids of circulant diallel in popcorn. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p. 1020-1030, 2008.

RAO, N. K. S.; SWAMY, R. D.; CHACO, E. K. Differentiation of plantlets in hybrid embryo callus of pineapple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 15, p. 235-238, 1981.

REIF, J. C.; WARBURTON, M. L.; XIA, X. C.; HOISINGTON, D. A.; CROSSA, J.; TABA, S.; MUMINOVIĆ, J.; BOHN, M.; FRISCH, M.; MELCHINGER, A. E. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, n.2, p. 177-185, 2006.

REIF, J. C.; XIA, X. C.; MELCHINGER, A. E.; WARBURTON, M. L.; HOISINGTON, D. A.; BECK, D.; BOHN, M.; FRISCH, M. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR markers. **Crop Science**, v. 44, n. 1, p. 326-334, 2004.

RESH, F. S.; SCAPIM, C. A.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; RAMOS, H. C. C.; VIVAS, M. Genetic diversity of popcorn genotypes using molecular analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9829-9840, 2015.

RIBEIRO TRINDADE, A. P.; BARTH PINTO, R. J.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, S.; SCAPIM, C. A. Genetic diversity of breeding popcorn lines determined by SSR

markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, pag. 4-5, 2010.

RIBEIRO, R. W. **Paisagem cultural e patrimônio**. Rio de Janeiro: Iphan, Copedoc, 2007.

RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M. M. **Glossary of genetics: Classical and molecular**. 5th edition. Springer-Verlag, 1991. 553p.

RINALDI D.A.; CARPENTIERI, P. V.; GERAGE, A.C.; RUAS, C.F.; FONSECA JÚNIOR, N.S.F.; SOUZA, A.; SOUZA, S.G.H.; GARBUGLIO, D.D. Correlação entre heterose e divergência genética estimadas por cruzamentos dialélicos e marcadores molecularesRAPD em populações de milho-pipoca. **Bragantia**, v. 66, n. 2, p. 183-192, 2007.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Genome Research**, v. 4, n. 5, p. 185-194, 1995.

RUFFATO, S.; CORRÊA, P.C.; MARTINS, J.H.; MANTOVANI, B.H.M; SILVA, J.N. Efeito das condições de colheita, pré-processamento e armazenamento na qualidade do milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 591-597, 2000.

SANTILLI, J. **Agrobiodiversidade e direitos dos agricultores**. São Paulo: Petrópolis. 2012. 519 p.

SAWAZAKI, E. ; GALLO, P. B.; SORDI, G.; LONGO, L. S. Estudo da capacidade de expansão em cruzamentos dialélicos entre variedades de milho pipoca. In: **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, n. 15, 1986, Maceió. Anais... Maceió: EMBRAPA, DDT. 1986, p. 157-160.

SAWAZAKI, E. **Melhoramento do milho-pipoca**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1995. 21p. (Documentos IAC, 53).

SAWAZAKI, E. A cultura de milho pipoca no Brasil. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 2, p. 11-13, 2001.

SAWAZAKI, E. Milho-pipoca, CD-ROM dos Anais do XXVIII **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Goiânia, GO, Brasil. 2010.

SCAPIM, C. A.; PACHECO, C. A. P.; TONET, A.; BRACCINI, A. D. L. E.; PINTO, R. J. B. Análise dialéctica e heterose de populações de milho-pipoca. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 219-230, 2002.

SCAPIM, C. A.; PINTO, R. B.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; MORA, F.; DANDOLINI, T. S. Combiningability of white grain popcorn populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 136-146, 2006.

SCAPIM, C.A.; DO AMARAL JÚNIOR, A.T.; VIEIRA, R.A.; MOTERLE, L.M.; TEIXEIRA, L.R.; VIGANÓ, J.; SANDOVAL JÚNIOR, G.B. Novos compostos de milho-pipoca para o Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 321-330, 2010.

SCHNEIDER, S. **La agricultura familiar en América Latina**. Fondo Nacional de Desarrollo Agrícola (FIDA)(Ed.), La agricultura familiar en América Latina, Cap. 1. 2014.

SELLIS, D.; CALLAHAN, B. J.; PETROV, D. A.; MESSER, P. W. Heterozygote advantage as a natural consequence of adaptation in diploids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 51, p. 20666-20671, 2011.

SEMAGN, K.; MAGOROKOSHO, C.; OGUGO, V.; MAKUMBI, D.; WARBURTON, M. L. Genetic relationships and structure among open-pollinated maize varieties adapted to eastern and southern Africa using microsatellite markers. **Molecular Breeding**, v. 34, n.3, p. 1423-1435, 2014.

SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, v. 38, n. 4, p. 1088-1098, 1998.

SILVA, N. C. A. **Conservação, diversidade e distribuição de variedades locais de milho e seus parentes silvestres no extremo oeste de Santa Catarina, sul do Brasil**. 2015. 230 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA, N. C. A.; VIDAL, R.; COSTA, F. M.; VAIO, M.; OGLIARI, J. B. Presence of Zealuxurians (*durieu* and *ascherson*) bird in Southern Brazil: Implications for the conservation of wild relatives of maize. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–16, 2015.

SILVA, N. C. A.; VIDAL, R.; OGLIARI, J. B. 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**, p. 1-14. 2016.

SILVA, T. A. D.; CANTAGALLI, L. B.; SAAVEDRA, J.; LOPES, A. D.; MANGOLIN, C. A.; DA SILVA, M. D. F. P.; SCAPIM, C. A. Population structure and genetic diversity of Brazilian popcorn germplasm inferred by microsatellite markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 181-187. 2015.

SILVA, T. A. D.; PINTO, R. J. B.; SCAPIM, C. A.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; CARVALHO, M. S. Genetic divergence in popcorn genotypes using microsatellites in bulk genomic DNA. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 31-36, 2009.

SINGODE, A. & PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in the North Eastern Himalayan maize landraces using microsatellite markers. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 33-41, 2010.

SOARES, A.C. **Milho crioulo conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. 185 p.

SOUZA, R. DE. **Diversidade de variedades crioulas de milho doce e adocicado conservadas por agricultores do oeste de Santa Catarina**. 2015. 190 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2015.

STELLA, A.; KAGEYAMA, P.; NODARI, R. **Políticas públicas para a agrobiodiversidade. Agrobiodiversidade e diversidade cultural**. Brasília: MMA, 2006. 84p.

TERRA, T. D. F.; WIETHÖLTER, P.; ALMEIDA, C. C. D. S.; BERED, F.; SERENO, M. J. C. D. M.; BARBOSA NETO, J. F. Genetic variability in

maize and teosinte populations estimated by microsatellite markers. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 205-211, 2011.

TESHOME, A.; BAUM, B. R.; FAHRIG, L.; TORRANCE, J. K.; ARNASON, T. J.; LAMBERT, J. D. Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] landrace variation and classification in north Shewa and south Welo, Ethiopia. **Euphytica**, v. 97, n. 3, p. 255-263, 1997.

VELDBOOM, L. R.; LEE, M.; WOODMAN, W. L. Molecular marker-facilitated studies in an elite maize population: I. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 1, p. 7-16, 1994.

VIGOUROUX, Y.; GLAUBITZ, J. C.; MATSUOKA, Y.; GOODMAN, M. M.; SÁNCHEZ, J.; DOEBLEY, J. Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. **American Journal of Botany**, n. 95, v. 10, p. 1240-1253, 2008.

VILLA, T. C. C.; MAXTED, N.; SCHOLTEN, M.; FORD-LLOYD, B. Defining and identifying crop landraces. **Plant genetic resources: characterization and utilization**, v. 3, n. 3, p. 373-384, 2005.

VOGT, A. G. **A dinâmica do uso e manejo de variedades locais de milho em propriedades agrícolas familiares**. 2005. 116 f. Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado), Florianópolis.

WARBURTON, M. L.; XIANCHUN, X.; CROSSA, J.; FRANCO, J.; MELCHINGER, A. E.; FRISCH, M.; BOHN, M.; HOISINGTON, D. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. **Crop Science**, v. 42, n. 6, p. 1832-1840, 2002.

WASALA, S. K.; & PRASANNA, B. M. Microsatellite marker-based diversity and population genetic analysis of selected lowland and mid-altitude maize landrace accessions of India. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 392-400, 2012.

WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations, **Ann. Eugen**, v. 15, p.323- 354, 1951.

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

Wright, S. **Variability within and among natural populations**. University of Chicago Press, 1978. v. 4. 580 p.

WU, Y. S.; ZHENG, Y. L.; SUN, R.; WU, S. Y.; GU, H. B.; BI, Y. H. Genetic diversity of waxy corn and popcorn landraces in Yunnan by SSR markers. **Acta Agronomica Sinica**, v. 30, n. 1, p. 36-42, 2004.

ZEVEN, A. C. Landraces: A review of definitions and classifications. **Euphytica**, Wageningen, v. 104, p. 127-139, 1998.

ZIEGLER, K.E. Popcorn. In: HALLAUER, A.R. ed. **Specialty corns**. 2nd ed. Boca Raton, Florida; CRC Press, p. 199-234. 2000.

ZINSLY, J. R. & MACHADO, J. A. Milho pipoca. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba: Fundação Cargill, p. 339-348, 1978.