

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AGRONOMIA

**RESGATE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE MILHO
CRIOULO PROSPECTADOS NO SEMIÁRIDO DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

MATHEUS HENRIQUE TEIXEIRA

Montes Claros –MG
2022

Matheus Henrique Teixeira

**RESGATE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE MILHO CRIOULO
PROSPECTADOS NO SEMIÁRIDO DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial,
para obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Orientador: Demerson Arruda Sanglard

Montes Claros –MG
Instituto de Ciências Agrárias - UFMG
2022

Matheus Henrique Teixeira. **RESGATE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE MILHO CRIOULO PROSPECTADOS NO SEMIÁRIDO DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Prof. Carlos Juliano Brant Albuquerque – ICA/UFMG

Ana Caroline Ataíde Silveira – Mestra ICA/UFMG

Luan Souza de Paula Gomes – Mestre ICA/UFMG



Prof. Demerson Arruda Sanglard – Orientador ICA/UFMG

Montes Claros, **06** de **Dezembro** de 20 **22** .

RESUMO

O semiárido mineiro inclui as mesorregiões Norte e Jequitinhonha, abrangendo uma população superior a dois milhões de habitantes em 140 municípios. Entre as diversas dificuldades para a otimização do sistema produtivo da agricultura familiar nestas mesorregiões, destaca-se a escassez de sementes crioulas adaptadas aos agroecossistemas específicos, que são bastante distintos das áreas experimentais utilizadas pelo melhoramento genético convencional. Com o declínio de pequenos produtores, perdem-se, também, variedades locais e o conhecimento tradicional associado – um dano incomensurável pela perda de reservatórios gênicos. O objetivo deste trabalho foi prospectar e caracterizar uma coleção de acessos de milhos crioulos do Norte de Minas Gerais, como subsídio ao início de um programa de melhoramento participativo. Foram realizadas visitas técnicas em seis comunidades rurais nas áreas de abrangência, obtendo-se relatos e parapeiros sobre variedades locais, um tanto escassas. Os depósitos ocorreram no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (campus Montes Claros), totalizando 44 variedades resgatadas, às quais foram caracterizadas por meio de oligonucleotídeos do tipo ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) quanto às suas distâncias genéticas relativas. Os diagnósticos locais comunitários, ainda que morosos e pouco céleres, permitiram angariar preciosos genótipos de milhos crioulos (Coleção Ativa), fontes de variabilidade para tolerância a estresses causados por pragas, doenças e limitações de clima, todos estes contextualizados ao semiárido.

Palavras-chave: Banco de Sementes. Marcadores Moleculares. Melhoramento Participativo. Variedades Locais. Zea mays L.

ABSTRACT

The semiarid region of Minas Gerais includes the North and Jequitinhonha mesoregions, covering a population of over two million inhabitants in 140 municipalities. Among the various difficulties in optimizing the production system of family farming in these mesoregions, the scarcity of native seeds adapted to specific agroecosystems stands out, which are quite different from the experimental areas used by conventional genetic improvement. With the decline of small producers, local varieties and associated traditional knowledge are also lost – immeasurable damage due to the loss of gene pools. The objective of this work was to prospect and characterize a collection of creole maize accessions from the North of Minas Gerais, as a subsidy for the beginning of a participatory breeding program. Technical visits were carried out in six rural communities in the areas covered, obtaining reports and whereabouts of local varieties, which are somewhat scarce. The deposits took place at the Biotechnology Laboratory of the Federal University of Minas Gerais - UFMG (Montes Claros *campus*), totaling 44 rescued varieties, which were characterized using ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) oligonucleotides in terms of their relative genetic distances. The local community diagnoses, although time consuming and not very quick, made it possible to gather precious genotypes of creole corns (Active Collection), sources of variability for tolerance to stresses caused by pests, diseases and climate limitations, all of which are contextualized in the semiarid region.

Keywords: Seed Bank. Molecular Markers. Participatory Breeding. Local Varieties. *Zea mays* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplos de aspectos de sementes de variedades de milhos crioulos resgatadas (nomenclatura informada na coleta) e caracterizadas quanto à diversidade genética.

..... 17

Figura 2 - Amplificações via PCR dos genomas de 44 variedades crioulas de milho, prospectadas no âmbito deste trabalho. As sequências ordinais (colunas) estão afeitas aos genótipos associados aos produtos das amostras que continham 25 uL de mix-PCR (Oligonucleotídeo ISSR 855 - temperatura de anelamento em 57°C), 5 uL de GelRedTM e 3 uL de corante tipo IV, submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), durante 3 h..... 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variedades de milho crioulo relatadas, resgatadas e caracterizadas quanto à diversidade genética no âmbito deste trabalho.....	18
Tabela 2 - Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA genômico de acessos de milhos crioulos, resgatados no âmbito deste trabalho.....	20
Tabela 3 - Matriz de distâncias genéticas relativas (frequência) entre 22 variedades de milho crioulas (grupo para tolerância a veranicos), no âmbito deste trabalho.....	24
Tabela 4 - Matriz de distâncias genéticas relativas (frequência) entre 22 variedades de milho crioulas (grupo para produção na ausência de insumos), no âmbito deste trabalho.....	25
Tabela 5 - Esquema de hibridações realizadas entre combinações de variedades divergentes de milho crioulo, com base em oligonucleotídeos ISSR.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CPCA - Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias

EMATER - Instituto de Assistência Técnica e Extensão Rural

FAO - Food and Agriculture Organization

FEHAN - Fazenda Experimental Professor Hamilton de Abreu Navarro

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISSR - Inter Simple Sequence Repeat

ICA – Instituto de Ciências Agrárias

PCR - Polymerase Chain Reaction

UCB - University of British Columbia

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	11
2.1 Milho Crioulo	11
2.2 Agricultura Familiar	13
2.3 Caracterização molecular do milho	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Localidades referenciais para prospecção de variedades.....	16
3.2 Caracterizações da diversidade genética	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Resgate de variedades e diagnósticos.....	17
4.2 Caracterizações da diversidade genética	20
5. COCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, 90% dos produtores de milho são pequenos agricultores (DUTRA *et al.*, 2021), cujas lavouras, em geral, têm baixa produtividade de grãos e silagem. As razões da baixa produtividade dos pequenos agricultores são diversas, como o alto custo dos insumos, baixo preço dos produtos agrícolas, dificuldade de acesso ao crédito rural e à tecnologia, e alta frequência de estresses bióticos e abióticos (MACHADO; MACHADO, 2007). Soma-se a estes problemas a falta de variedades adaptadas aos diferentes tipos de estresse para ambientes locais e específicos.

Para a cultura do milho, no Brasil, constata-se que as lavouras com áreas abaixo de 10 hectares podem ser conduzidas pela força de trabalho familiar. Elas estão predominantemente em regiões marginais e correspondem a 30% da produção nacional, abrangendo 94,3% dos produtores (EMATER, 2019). Para essa categoria de agricultores, os avanços científicos têm tido contribuição muito aquém do desejado. Nas propriedades rurais das áreas marginais, a cultura do milho é considerada de muita importância, pois tem o potencial de viabilizar o sistema produtivo pela agregação dos valores na propriedade e pela função do milho na alimentação humana e animal (MACHADO *et al.*, 2011).

De acordo com Machado (2007), o conhecimento dos agricultores sobre as variedades locais e espécies silvestres pode ser utilizado na busca por novas características e produtos de interesse para o melhoramento de plantas e biotecnologias. Uma das estratégias definidas com base no Plano de Ação Global para Segurança Alimentar da FAO, refere-se ao uso e à preservação da diversidade genética de plantas, dentro de comunidades agrícolas (FAO, 2012). O trabalho conjunto entre o setor formal e o setor informal (representado pelas comunidades rurais), no manejo da agrobiodiversidade, pode contribuir na conservação de germoplasmas adaptados aos agroecossistemas das comunidades agrícolas (DE BOEF; THIJSEN, 2007). Assim, as abordagens participativas tornam-se de cruciais importâncias para o desenvolvimento de trabalhos com pequenos agricultores, evitando-se a erosão genética.

A mesorregião Norte de Minas Gerais, predominantemente semiárida, abrange uma população superior a dois milhões de habitantes, distribuídos em 140 municípios, o que equivale a 10,46% da área brasileira com este clima (IBGE, 2010). A agricultura familiar nestas localizações também está vulnerável a todas as questões supracitadas, tendo ainda, como condição agravante, o uso de sementes inapropriadas aos seus agroecossistemas específicos. Isso significa que eles não possuem equivalência ambiental às estações experimentais de empresas, onde as semeaduras são efetuadas para os procedimentos de melhoramento genético.

Neste sentido, uma estratégia para gerar a independência do pequeno agricultor com relação às sementes comerciais, é fazer com que ele mesmo ou suas comunidades as produzam de forma contextualizada e holística (abrangente), adaptadas para as realidades de suas próprias localidades (CGIAR, 1999). Este trabalho teve como objetivo principal a recuperação e caracterização molecular das escassas variedades locais de milho crioulo.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Milho Crioulo

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea pertencente à família botânica Poaceae, é uma cultura que apresenta alta produtividade, com importância econômica e social (BUCKLER; STEVENS, 2006). Considera-se que o centro de origem do milho foi no México há cerca de 9.000 anos, onde ocorreu sua domesticação e surgimento de diferentes tipos de milho, a partir de seleção e reprodução dos melhores grãos cuja finalidade principal, era a alimentação (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2022). Após, houve sua distribuição para o continente americano, Europa, continente asiático e africano (SUÁREZ; CHÁVEZ; MARISCAL, 2013; MARTÍNEZ *et al.*, 2015).

O milho destaca-se como um dos cereais mais cultivados no mundo, representa importante papel na economia com seu valor comercial. Possui boa habilidade de adaptação em diferentes condições ambientais, o que lhe confere boa produtividade, além de ser uma cultura versátil, pois está presente na alimentação humana e animal (SILVEIRA *et al.*, 2015). O milho é ofertado de diferentes formas, seja em grãos, rações e silagens, farinhas, processados e derivados para a indústria.

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, espera-se que a produção de milho na safra 2022/23 seja de 126,9 milhões de toneladas por hectares, o que representa um aumento de cerca de 12,5% em relação às safras anteriores. O que fomenta uma margem de aumento também no tamanho de área plantada, com um aumento de 3,8% e cerca de 8,4% da produtividade do milho (CONAB, 2022).

Eventualmente, o milho plantado refere-se a cultivares comerciais advindas de melhoramentos genéticos, como o milho transgênico. Além do milho geneticamente modificado, tem-se as variedades tradicionais que não foram apropriadas pela indústria, como o milho crioulo. O milho denominado crioulo, é uma raça que apresenta elevada variabilidade genética, e tem características como rusticidade e adaptação a diferentes ambientes, onde são cultivados (ARAÚJO; NASS, 2002).

O milho crioulo diferencia-se das cultivares comerciais por não apresentarem elevada produção, mas atendem as necessidades do produtor rural que as escolhem devido a sua variabilidade genética, e requer menos investimento tecnológico, sendo que, é possível a produção própria de sementes para plantios futuros (EICHOLZ *et al.*, 2017). Já as cultivares comerciais são protegidas pela lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997, regulamentada pelo Decreto nº 2.366, de 5 de novembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), em que ficou reconhecido a propriedade intelectual das cultivares lançadas e garantido o direito de patente aos obtentores de plantas para a sua exploração comercial (COSTA, 2021).

Por apresentarem desenvolvimento e adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, o milho crioulo é um material genético bem adaptável ao cultivo, tanto que se adequaram a regiões onde são tradicionalmente cultivados (SIERRA *et al.*, 2016).

De acordo com MARTÍNEZ *et al.*, (2015), comparando-se o milho crioulo com o convencional, vê-se que o convencional apresenta maior rendimento de grãos, mas para que isso ocorra, são necessários investimentos em sementes, insumos e tecnologias para que ele expresse seu máximo potencial produtivo. Já as variedades crioulas apresentam menor rendimento, mas sua produção não é tão exigente em insumos e tecnologias. Pois se adaptaram a regiões com pouca disponibilidade hídrica, solos com baixa nutrição e pouco férteis (SALAZAR; BOSCHINI, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2015).

A produção do milho crioulo por não exigir altos níveis tecnológicos e insumos, tornou-se uma opção de plantio mais sustentável dentro das pequenas propriedades, em muitas das vezes são atreladas a plantios agroflorestais e agroecológicos (ABREU, CANSI, JURIATTI, 2007).

As raças de milho crioulo desempenham papel importante em termos de variabilidade genética, sendo fundamentais para os programas de melhoramento genético dessa cultura, que busca cada vez mais por genes tolerantes a injúrias bióticas e abióticas (ARAÚJO; NASS, 2002).

A cultura do milho crioulo é presente em muitas propriedades que praticam a agricultura familiar, nestes sistemas de produção, as variedades de milho são passadas a cada geração. Muitos agricultores denominados guardiões das sementes, conservam em sua propriedade diferentes genótipos de sementes. Os guardiões definem qual milho é mais apropriado para sua região levando em consideração as características que possuem de adaptabilidade. Além disso são responsáveis por manter as variedades, realizam trocas, aumentando assim os bancos de germoplasma (EICHOLZ *et al.*, 2017).

Desta forma, é perceptível que a produção do milho crioulo é fundamentalmente realizada pela agricultura familiar, assim como sua conservação e dispersão, não só de diferentes sementes, mas de conhecimento tradicional passado de geração para geração.

2.2 Agricultura Familiar

De acordo com a Lei 11.326, de 24 de julho de 2006, a agricultura familiar pode ser definida como aquela, em que toda atividade agrícola é praticada no meio rural, toda a gestão da propriedade é feita pela família e a renda é obtida por meio de tais atividades. A agricultura familiar estende-se a pequenos produtores, povos e comunidades tradicionais, assentados de reforma agrária, e demais povos em que suas atividades vem de suas terras (BRASIL, 2006).

A agricultura familiar tem sido responsável por grande parte da produção de alimentos que chegam à mesa da população brasileira, além de produzirem para consumo próprio. Com os dados obtidos no último censo agropecuário realizado no ano de 2017, a agricultura familiar se destaca por sua produção de alimentos diversificada, dentre elas, o milho aparece como primeiro produto (IBGE, 2017).

Esta produção de milho da agricultura familiar, não é compreendida apenas ao milho comercial ou geneticamente modificado, pois grande parte destes produtores são detentores de sementes de milho locais, as sementes crioulas. A produção do milho crioulo pela agricultura familiar visa um resgate do material genético rustico, e que tenham menor ou nenhuma dependência de investimentos em insumos para sua produção (SANDRI; TOFANELLI, 2008).

A continuidade ou a busca pela produção de milhos adaptados a diferentes condições climáticas por parte de agricultura familiar, pode estar atrelada também há um benefício maior, voltado para produções sustentáveis. Visto que o setor agrícola é desafiado cada vez mais a produzir alimentos em meio a desastres ambientais e mudanças climáticas, que interferem de forma direta na produção (SUESS-REYES; FUETSCH, 2016).

Os agricultores familiares que cultivam o milho crioulo, entendem a importância que as sementes crioulas representam para aquela região onde estão inseridos. De acordo com DALMORA *et al.* (2018), o cultivo de espécies crioulas rendem benefícios aos agricultores que dispõem de pequenas áreas e poucos recursos. Como por exemplo: não precisam comprar sementes, não precisam investir financeiramente na compra de insumos como adubos, herbicidas e inseticidas, como também são conhecedores dos materiais genéticos e suas adaptações.

As sementes do milho crioulo resultam de seleção massal, um método antigo de melhoramento de plantas, praticado pelos agricultores (BESPALHOK, GUERRA, OLIVEIRA, 2014). Escolhem para plantar as melhores espigas, dentre as que são mais produtivas, adequadas para alimentação humana ou animal, resistência a pragas e doenças e também se produzem em solos pobres sem a necessidade de investir em insumos (GUERRA; ROCHA; NODARI, 2015). Assim, vão mantendo os plantios a cada geração preservando a semente que mais atendem as exigências de cada agricultor.

Apesar da agricultura familiar se empenhar em manter suas sementes de milho crioulas, deve se evitar que ocorra a erosão genética, sendo necessários estudos de divergências genéticas nos genótipos crioulos para obtenção e conhecimento de novos genes resistentes a fatores bióticos e abióticos.

2.3 Caracterização molecular do milho

O resgate e a distinção das sementes crioulas, demonstra a importância da agricultura familiar para a proteção e conservação dos materiais genéticos presentes nas suas respectivas regiões, que estão cada vez mais escassos. Sendo que o ato de cultivar o mesmo material durante muitos anos, faz com que haja seleção das melhores variedades adaptadas para a região e ao mesmo tempo permite que seja criado um banco genético de suma importância para o desenvolvimento social e econômico das comunidades agrícolas (ARAÚJO; FARIAS, 2018).

Ademais, os agricultores familiares, que são protetores dessas sementes conhecidas como “crioulas”, são os mais apropriados para descrever a finalidade e as características agrônômicas das variedades crioulas locais, como tolerância a fatores edafoclimáticos, potencial produtivo sem a utilização de insumos, coloração do grão e da palha, altura de planta, dentre outros. Entretanto, com o desenvolvimento de novas variedades, mais tecnológicas e melhoradas, contribui ainda mais para a escassez das diferentes variedades crioulas adaptadas aos agroecossistemas específicos (CURADO *et al.*, 2020).

De acordo com Carpentieri-Pípolo *et al.* (2010), variedades de milho crioulo que apresentam adaptação em uma determinada localidade, conduzidos em baixo nível tecnológico, sem a utilização de controle fitossanitário e aplicação de fertilizantes, podem apresentar um potencial produtivo elevado. Assim, possibilitando uma maior estabilidade para os pequenos produtores e auxiliando na sua consolidação enquanto agricultores familiares.

Para o melhoramento das plantas, é necessário que os materiais utilizados expressem heterose, que ocorra dominância na expressão do caráter, e que permita a máxima expressão do vigor híbrido.

Sendo que as variedades crioulas apresentam grande diversidade genética o que os tornam importantes para os programas de melhoramento e desenvolvimento de novas cultivares (RIBEIRO, 2012). Esses materiais são cultivados, principalmente, pelos agricultores familiares, em que apresentam um custo de produção relativamente baixo, devido as variedades possuírem adaptação as suas respectivas regiões e apresentarem um material genético com rusticidade. Por isso, são importantes para o desenvolvimento de variedades mais produtivas e de menores custos (SANDRI; TOFANELLI, 2008).

Por meio da determinação de características agromorfológicas, a diversidade genética também pode ser mensurada pela variação molecular, como por exemplo pelas sequências de moléculas que possuem a informação genética, como o DNA que permitem o acesso a uma vasta cobertura genômica. (SALLA *et al.*, 2002).

Os marcadores moleculares permitem acesso direto ao genótipo da planta, sendo uma ferramenta auxiliar no melhoramento genético. Uma forma rápida de obtenção de informações genéticas é por meio de marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), além de ser de fácil acesso, pode ser aplicada em diferentes espécies de plantas como nas variedades crioulas (CASU *et al.*, 2006).

O marcador molecular ISSR são segmentos que permitem uma amplificação na sequência de DNA, demarcando regiões chamadas de microssatélites invertidas, sendo bastante encontradas no genoma. O marcador molecular ISSR vem sendo utilizado para caracterizar variabilidade genética entre diferentes genótipos, pois é uma técnica com vantagens por ser reprodutível, apresentar baixo custo, além do elevado grau de polimorfismo e não necessitar primariamente de conhecimento a respeito da sequência de DNA para construção do primer que será utilizado (BORBA *et al.*, 2005; DOMINGUES *et al.*, 2017).

A técnica vem sendo realizada com diferentes culturas para estudos de diversidades genéticas, como em variedades de milho crioulo e variedades melhoradas (CARVALHO *et al.*, 2002), fava crioula (TERZOPOULOS; BEBELI, 2008), *Puccinia polysora* (UNARTNGAM; JANRUANG; TO-ANAN, 2011), fava (WONG *et al.*, 2012), variedades crioulas de abóboras (PRIORI *et al.*, 2012) e camucamuzeiro (SILVA *et al.*, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localidades referenciais para prospecção de variedades

Foram realizadas expedições em comunidades rurais de seis municípios do Norte de Minas Gerais: Almenara ('Associação de Pequenos Produtores Rurais da Agricultura Familiar de Almenara'); Capitão Enéas ('Associação Comunitária Rural de Poção'); Janaúba ('Associação Comunitária Evangelho Unido em Cristo'); Rio Pardo de Minas ('Associação de Mulheres de Olhos D'água Unidas pela Amizade'); São João do Paraíso ('Associação das Trabalhadores Rurais do Paraguai'); Taiobeiras ('Associação da Comunidade de Atanásio'). Adotou-se as estratégias holísticas propostas por Machado e Machado (2007), levando-se em consideração as agrobiodiversidades locais. As expedições foram relevantes para alcançar relatos de paradiços, costumes, experiências, observações empíricas e posteriores repasses de sementes, muitas vezes de agricultores que não pertencentes às associações propriamente.

3.2 Caracterizações da diversidade genética

Todos os procedimentos de manutenção de populações segregantes e análises moleculares foram realizados nas dependências do Laboratório de Biotecnologia, localizado no Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias - CPCA, Campus Regional da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Os plantios para multiplicações de sementes e hibridações intervarietais ocorreram em telados anexos ao CPCA e área a campo vinculada ao Laboratório de Biotecnologia, integrante da Fazenda Experimental Professor Hamilton de Abreu Navarro (FEHAN), Campus Montes Claros da UFMG.

Amostras de tecidos foliares de cada variedade foram armazenadas em ultrafreezer (-75°C). As análises moleculares envolveram extrações de DNA por método baseado em Doyle e Doyle (1990) visando amplificações via PCR (Polymerase Chain Reaction). Foram utilizados oligonucleotídeos (primers) ISSR (Inter Simple Sequences Repeats), de escolhas randomizadas, oriundos da coleção UCB (University of British Columbia, Canada) (Termociclador Biocycler Gradient). As reações foram programadas em uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguida por 35 ciclos de [desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (46°C a 59°C / 1 min) e extensão (72°C/2 minutos)]; e uma fase de extensão final de 72°C por 7 min. Logo após essas ciclagens, o aparelho conservou as reações a 4°C, até a retirada das amostras. Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese horizontal com géis de agarose 1,5% (m/v), imersos em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). No momento da aplicação, foram adicionados, à cada amostra, 3 µL do corante

tipo IV [0,125% (m/v) de azul-de-bromofenol e 10% (m/v) de sacarose] e 5 uL de GelRed™ (Sambrook *et al.*, 1989). Os géis foram submetidos a uma carga de 120 V, por 3 h. Findadas as eletroforeses, os géis foram analisados por meio de um sistema de fotodocumentação (Loccus Biotecnologia, modelo L-PIX Sti). Os padrões de bandeamentos foram convertidos em matrizes de dados binários, considerando-se a presença (1) e a ausência (0) de bandas aferidas nos géis. O coeficiente para o cálculo de similaridade genética foi obtido com base no complemento aritmético do coeficiente de coincidências simples. As análises foram executadas com o auxílio do programa computacional Genes (Cruz, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resgate de variedades e diagnósticos

A busca por sementes focou em materiais considerados como tradicionais (crioulos) (Figura 1), porém, muitas vezes, os relatos e colaborações resultavam em sementes comerciais que já haviam sido produzidas por técnicas de melhoramento convencional, ou seja, genótipos advindos de empresas públicas ou privadas. Os acessos em que não se tinha nomenclatura popular, foram identificados por nomes relacionados à região de origem por proposição da equipe deste projeto (Tabela 1).

Figura 1 - Exemplos de aspectos de sementes de variedades de milhos crioulos resgatadas (nomenclatura informada na coleta) e caracterizadas quanto à diversidade genética.



Tabela 1 - Variedades de milho crioulo relatadas, resgatadas e caracterizadas quanto à diversidade genética no âmbito deste trabalho.

Referência laboratorial	Nome popular ou codificação de coleta	Imediações rurais do município de referência	Separação de característica edafoclimático potencial	Cor da semente
1	Milho Branco	Janaúba	Nível de tolerância a veranicos	Branco / Creme claro
2	Colorido Vinhedo	São João do Paraíso	Nível de tolerância a veranicos	Roxo / Avermelhado
3	Cateto	Rio Pardo de Minas	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo
4	Milho Preto	São João do Paraíso	Nível de tolerância a veranicos	Roxo escuro
5	Almenara 1	Almenara	Nível de tolerância a veranicos	Alaranjado
6	Almenara 2	Almenara	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo / Alaranjado
7	Capitão Enéas 1	Capitão Enéas	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo
8	Capitão Enéas 2	Capitão Enéas	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo claro
9	Janaúba 1	Janaúba	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo
10	Janaúba 2	Janaúba	Nível de tolerância a veranicos	Avermelhado
11	Janaúba 3	Janaúba	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo / Alaranjado
12	Montes Claros 1	Montes Claros	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo
13	Montes Claros 2	Montes Claros	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo
14	Montes Claros 3	Montes Claros	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo
15	Montes Claros 4	Montes Claros	Nível de tolerância a veranicos	Creme claro
16	São João do Paraíso 1	São João do Paraíso	Nível de tolerância a veranicos	Roxo
17	São João do Paraíso 2	São João do Paraíso	Nível de tolerância a veranicos	Alaranjado
18	São João do Paraíso 3	São João do Paraíso	Nível de tolerância a veranicos	Alaranjado
19	São João do Paraíso 4	São João do Paraíso	Nível de tolerância a veranicos	Roxo
20	São João do Paraíso 5	São João do Paraíso	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo
21	Rio Pardo de Minas 1	Rio Pardo de Minas	Nível de tolerância a veranicos	Amarelo claro

22	Rio Pardo de Minas 2	Rio Pardo de Minas	Nível de tolerância a veranicos	Avermelhado
23	Taiobeiras 1	Taiobeiras	Produção na ausência de insumos	Amarelo
24	Taiobeiras 2	Taiobeiras	Produção na ausência de insumos	Amarelo
25	Asteca	Montes Claros	Produção na ausência de insumos	Amarelo
26	Branco da Barra	Janaúba	Produção na ausência de insumos	Branco / Creme claro
27	Sabuco Fino	Montes Claros	Produção na ausência de insumos	Alaranjado
28	Francês Colorido Branco	Janaúba	Produção na ausência de insumos	Creme / Roxo
29	Mexicano	Rio Pardo de Minas	Produção na ausência de insumos	Creme / Roxo
30	Vinhedo	São João do Paraíso	Produção na ausência de insumos	Roxo / Avermelhado
31	Pipoqueiro Espinhudo	São João do Paraíso	Produção na ausência de insumos	Creme Claro / Amarelo
32	Milho Coruja	São João do Paraíso	Produção na ausência de insumos	Alaranjado
33	Janaúba 6	Janaúba	Produção na ausência de insumos	Branco / Creme claro
34	Janaúba 7	Janaúba	Produção na ausência de insumos	Amarelo
35	Janaúba 8	Janaúba	Produção na ausência de insumos	Branco / Creme claro
36	Montes Claros 5	Montes Claros	Produção na ausência de insumos	Amarelo
37	Montes Claros 6	Montes Claros	Produção na ausência de insumos	Avermelhado / Amarelo
38	Montes Claros 7	Montes Claros	Produção na ausência de insumos	Amarelo
39	São João do Paraíso 6	São João do Paraíso	Produção na ausência de insumos	Roxo / Avermelhado
40	São João do Paraíso 7	São João do Paraíso	Produção na ausência de insumos	Amarelo
41	São João do Paraíso 8	São João do Paraíso	Produção na ausência de insumos	Alaranjado
42	Rio Pardo de Minas 3	Rio Pardo de Minas	Produção na ausência de insumos	Alaranjado
43	Rio Pardo de Minas 4	Rio Pardo de Minas	Produção na ausência de insumos	Alaranjado
44	Taiobeiras 3	Taiobeiras	Produção na ausência de insumos	Amarelo / Creme claro

4.2 Caracterizações da diversidade genética

Foram conduzidos ensaios de gradientes de temperaturas de anelamento, como forma de averiguar as capacidades de amplificações com os diferentes oligonucleotídeos (primers) ISSR disponíveis. As temperaturas do gradiente foram intervaladas entre 45°C e 65°C, conforme recurso de randomização próprio aparelho termociclador (Eppendorf, Nexus Gradient). Durante a execução das análises moleculares, foram testados 56 oligonucleotídeos ISSR, cujos os resultados estão sintetizados na Tabela 2. Deste total, 34 caracterizam-se como sendo amplamente polimórficos, sob as temperaturas de anelamento específicas identificadas neste procedimento.

Tabela 2 - Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA genômico de acessos de milho crioulo, resgatados no âmbito deste trabalho.

Código do oligonucleotídeo (Sequência 5' → 3')	Temperatura de anelamento
ISSR 803 (ATA TAT ATA TAT ATA TC)	Não amplifica na espécie
ISSR 804 (TAT ATA TAT ATA TAT AA)	Não amplifica na espécie
ISSR 805 (TAT ATA TAT ATA TAT AC)	Não amplifica na espécie
ISSR 807 (AGA GAG AGA GAG AGA GT)	51°C
ISSR 808 (AGA GAG AGA GAG AGA GC)	48°C
ISSR 812 (GAG AGA GAG AGA GAG AA)	45°C
ISSR 818 (CAC ACA CAC ACA CAC AG)	58°C
ISSR 820 (GTG TGT GTG TGT GTG TC)	46°C
ISSR 823 (TCT CTC TCT CTC TCT CC)	56°C
ISSR 827 (ACA CAC ACA CAC ACA CG)	47°C
ISSR 830 (TGT GTG TGT GTG TGT GG)	54°C
ISSR 833 (ATA TAT ATA TAT ATA TYG)	Não amplifica na espécie
ISSR 838 (TAT ATA TAT ATA TAT ARC)	Não amplifica na espécie
ISSR 842 (GAG AGA GAG AGA GAG AYG)	46°C
ISSR 848 (CAC ACA CAC ACA CAC ARG)	49°C
ISSR 850 (GTG TGT GTG TGT GTG TYC)	46°C
ISSR 856 (ACA CAC ACA CAC ACA CYA)	46°C
ISSR 858 (TGT GTG TGT GTG TGT GRT)	59°C
ISSR 863 (AGT AGT AGT AGT AGT AGT)	Não amplifica na espécie
ISSR 867 (GGC GGC GGC GGC GGC GGC)	55°C
ISSR 870 (TGC TGC TGC TGC TGC TGC)	Não amplifica na espécie
ISSR 876 (GAT AGA TAG ACA GAC A)	46°C
ISSR 883 (BVB TAT ATA TAT ATA TA)	Não amplifica na espécie
ISSR 884 (HBH AGA GAG AGA GAG AG)	58°C
ISSR 886 (VDV CTC TCT CTC TCT CT)	60°C
ISSR 888 (BDB CAC ACA CAC ACA CA)	56°C

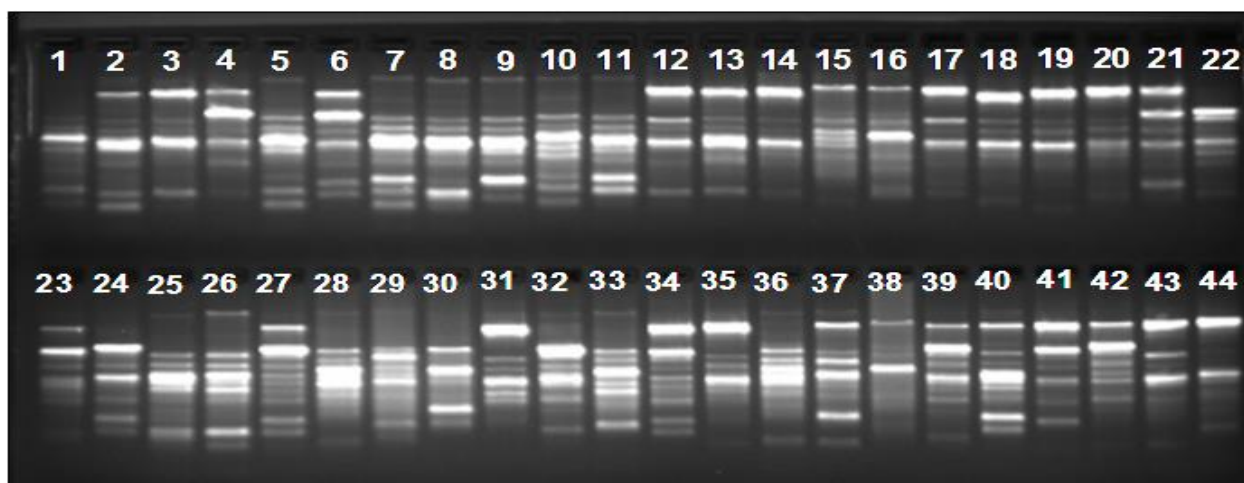
ISSR 892 (TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C)	Não amplifica na espécie
ISSR 894 (TGG TAG CTC TTG ATC ANN NNN)	Não amplifica na espécie
ISSR 895 (AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC)	Não amplifica na espécie
ISSR 897 (CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G)	Não amplifica na espécie
ISSR 898 (GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G)	Não amplifica na espécie
ISSR 900 (ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA)	Não amplifica na espécie
ISSR 814 (CTC TCT CTC TCT CTC TA)	Monomórfico
ISSR 828 (TGT GTG TGT GTG TGT GA)	48°C
ISSR 829 (TGT GTG TGT GTG TGT GC)	46°C
ISSR 843 (CTC TCT CTC TCT CTC TRA)	Não amplifica na espécie
ISSR 849 (GTG TGT GTG TGT GTG TYA)	52°C
ISSR 866 (CTC CTC CTC CTC CTC CTC)	52°C
ISSR 877 (TGC ATG CAT GCA TGC A)	Monomórfico
ISSR 879 (CTT CAC TTC ACT TCA)	Monomórfico
ISSR 810 (GAG AGA GAG AGA GAG AT)	48°C
ISSR 816 (CAC ACA CAC ACA CAC AT)	56°C
ISSR 825 (ACA CAC ACA CAC ACA CT)	49°C
ISSR 836 (AGA GAG AGA GAG AGA GYA)	45°C
ISSR 844 (CTC TCT CTC TCT CTC TRC)	Não amplifica na espécie
ISSR 847 (CAC ACA CAC ACA CAC ARC)	47°C
ISSR 853 TCT CTC TCT CTC TCT CRT)	Monomórfico
ISSR 855 (ACA CAC ACA CAC ACA CYT)	57°C
ISSR 864 (ATG ATG ATG ATG ATG ATG)	62°C
ISSR 865 (CCG CCG CCG CCG CCG CCG)	60°C
ISSR 874 (CCC TCC CTC CCT CCC T)	Não amplifica na espécie
ISSR 880 (GGA GAG GAG AGG AGA)	56°C
ISSR 882 (VBV ATA TAT ATA TAT AT)	Não amplifica na espécie
ISSR 887 (DVD TCT CTC TCT CTC TC)	54°C
ISSR 889 (DBD ACA CAC ACA CAC AC)	52°C
ISSR 890 (VHV GTG TGT GTG TGT GT)	46°C

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T).

Foram caracterizadas todas as 44 variedades de milho crioulo resgatadas nos âmbitos deste projeto, envolvendo os 34 oligonucleotídeos ISSR identificados como polimórficos. As análises de distâncias genéticas foram realizadas a partir das amplificações das 44 variedades de milhos crioulos resgatadas, divididas em dois grupos de 22 acessos por circunstância da potencial vantagem fenotípica ("nível de tolerância a veranicos" e "produção na ausência de insumos"). Os 34 oligonucleotídeos ISSR utilizados produziram 32 bandas monomórficas e 213 bandas polimórficas, totalizando 245 bandas amplificadas, o que está exemplificado na Figura 2.

A quantidade de bandas variou de 15 [(GA) 8C] a 3 [(GA) 8YT], com média de 7,2 por oligonucleotídeo. Do total de bandas amplificadas, 86,94% revelaram polimorfismo, sugerindo uma elevada variabilidade genética entre as 44 variedades de milhos crioulos resgatadas, em relação aos dados geralmente encontrados no melhoramento convencional (Carvalho *et al.*, 2002; Dandolini *et al.*, 2008; Munhoz *et al.*, 2009). Os oligonucleotídeos em que prevalece a sequência de bases GA amplificaram o maior número de fragmentos polimórficos (dados não apresentados).

Figura 2 - Amplificações via PCR dos genomas de 44 variedades crioulas de milho, prospectadas no âmbito deste trabalho. As sequências ordinais (colunas) estão afeitas aos genótipos associados aos produtos das amostras que continham 25 uL de mix-PCR (Oligonucleotídeo ISSR 855 - temperatura de anelamento em 57°C), 5 uL de GelRedTM e 3 uL de corante tipo IV, submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), durante 3 h.



Nas Tabelas 3 e 4 encontram-se as matrizes de distâncias genéticas relativas (%). A partir dos dados, identificou-se as variedades mais divergentes entre si (menos similares), o que orientou os esquemas de hibridações intervarietais recíprocas, resguardando efeitos maternos quanto aos padrões de tegumentos. A diferenciação genética observada neste trabalho é bastante superior à maioria dos estudos de diversidade, sejam eles envolvendo animais, plantas e microrganismos; executados com a mesma coleção de oligonucleotídeos da University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada) (Souza *et al.*, 2008; George *et al.*, 2009; Anand *et al.*, 2010; Rizkalla, *et al.*, 2012; Ghazalli *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015).

De acordo com Cruz *et al.* (2011), o estudo da diversidade visa a elucidar relações genéticas, quantificar ou prever o nível de variabilidade total existente e a sua distribuição entre e/ou dentro de unidades taxonômicas, quer elas envolvam indivíduos; acessos de banco de germoplasma; linhagens; cultivares; populações de sistemas controlados de acasalamento ou naturais (exogâmicas); e espécies. Os autores ainda acrescentam que este conhecimento tem proporcionado importantes

contribuições ao melhoramento genético, ao gerenciamento de bancos de germoplasma, à conservação de recursos genéticos e ao entendimento dos processos evolutivos.

Tabela 3 - Matriz de distâncias genéticas relativas (frequência) entre 22 variedades de milho crioulas (grupo para tolerância a veranicos), no âmbito deste trabalho.

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	1,00																					
2	0,93	1,00																				
3	0,91	0,89	1,00																			
4	0,92	0,79*	0,88	1,00																		
5	0,90	0,88	0,89	0,92	1,00																	
6	0,93	0,91	0,87	0,84	0,91	1,00																
7	0,92	0,87	0,90	0,93	0,92	0,76*	1,00															
8	0,82	0,91	0,94	0,89	0,82	0,95	0,87	1,00														
9	0,95	0,88	0,92	0,86	0,91	0,88	0,83	0,88	1,00													
10	0,91	0,89	0,88	0,89	0,89	0,93	0,95	0,89	0,93	1,00												
11	0,88	0,87	0,89	0,87	0,84	0,86	0,98	0,94	0,95	0,92	1,00											
12	0,89	0,90	0,87	0,90	0,89	0,88	0,93	0,90	0,90	0,94	0,94	1,00										
13	0,75*	0,94	0,90	0,94	0,87	0,89	0,92	0,94	0,94	0,91	0,93	0,92	1,00									
14	0,88	0,92	0,94	0,92	0,90	0,77*	0,83	0,92	0,90	0,89	0,92	0,94	0,90	1,00								
15	0,87	0,84	0,92	0,88	0,94	0,90	0,91	0,96	0,84	0,87	0,90	0,86	0,94	0,90	1,00							
16	0,89	0,90	0,91	0,85	0,92	0,94	0,88	0,89	0,96	0,84	0,94	0,93	0,91	0,94	0,91	1,00						
17	0,89	0,84	0,88	0,94	0,88	0,92	0,90	0,87	0,87	0,86	0,90	0,83	0,90	0,94	0,87	0,89	1,00					
18	0,83	0,92	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,94	0,86	1,00				
19	0,95	0,90	0,87	0,70*	0,97	0,90	0,88	0,92	0,85	0,88	0,94	0,86	0,90	0,94	0,87	0,89	0,82	0,87	1,00			
20	0,92	0,93	0,90	0,90	0,94	0,90	0,83	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,96	0,94	0,88	0,94	0,87	0,94	0,91	1,00		
21	0,92	0,83	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,93	0,89	0,92	0,94	0,90	0,93	0,92	0,86	0,92	1,00	
22	0,85	0,90	0,94	0,87	0,89	0,94	0,87	0,89	0,87	0,89	0,93	0,85	0,90	0,89	0,92	0,94	0,83	0,96	0,86	0,90	0,89	1,00

*Combinações de variedades mais divergentes entre si (menos similares).

Tabela 4 - Matriz de distâncias genéticas relativas (frequência) entre 22 variedades de milho crioulas (grupo para produção na ausência de insumos), no âmbito deste trabalho.

Nº	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
23	1,00																					
24	0,92	1,00																				
25	0,91	0,85	1,00																			
26	0,90	0,94	0,86	1,00																		
27	0,94	0,92	0,90	0,77*	1,00																	
28	0,92	0,88	0,94	0,90	0,82	1,00																
29	0,91	0,85	0,92	0,94	0,92	0,86	1,00															
30	0,88	0,94	0,78*	0,92	0,82	0,95	0,87	1,00														
31	0,95	0,88	0,87	0,89	0,91	0,88	0,83	0,88	1,00													
32	0,91	0,89	0,90	0,77*	0,89	0,93	0,95	0,89	0,93	1,00												
33	0,88	0,87	0,89	0,87	0,84	0,86	0,98	0,94	0,95	0,87	1,00											
34	0,95	0,88	0,87	0,95	0,88	0,92	0,86	0,91	0,90	0,94	0,84	1,00										
35	0,91	0,89	0,90	0,91	0,89	0,88	0,89	0,89	0,86	0,98	0,94	0,85	1,00									
36	0,88	0,87	0,94	0,88	0,87	0,89	0,87	0,84	0,88	0,89	0,90	0,95	0,96	1,00								
37	0,87	0,84	0,92	0,95	0,88	0,92	0,86	0,91	0,89	0,87	0,94	0,91	0,89	0,90	1,00							
38	0,89	0,90	0,91	0,91	0,89	0,88	0,89	0,89	0,87	0,90	0,92	0,88	0,87	0,94	0,91	1,00						
39	0,89	0,84	0,88	0,94	0,72*	0,92	0,88	0,94	0,90	0,94	0,96	0,95	0,88	0,94	0,87	0,85	1,00					
40	0,83	0,92	0,89	0,90	0,94	0,87	0,85	0,92	0,94	0,92	0,89	0,96	0,94	0,87	0,89	0,94	0,86	1,00				
41	0,95	0,90	0,87	0,85	0,97	0,90	0,94	0,88	0,92	0,91	0,87	0,87	0,90	0,95	0,88	0,92	0,86	0,93	1,00			
42	0,92	0,93	0,90	0,90	0,94	0,90	0,87	0,84	0,86	0,88	0,94	0,95	0,96	0,91	0,89	0,88	0,89	0,89	0,91	1,00		
43	0,92	0,83	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,90	0,94	0,89	0,89	0,93	0,89	0,88	0,87	0,89	0,87	0,84	0,86	0,92	1,00	
44	0,85	0,90	0,94	0,87	0,95	0,88	0,92	0,86	0,91	0,95	0,88	0,92	0,86	0,89	0,92	0,94	0,83	0,96	0,86	0,90	0,90	1,00

*Combinações de variedades mais divergentes entre si (menos similares).

Adotou-se como critério de hibridação intervartietal, as combinações em que as variedades apresentaram divergência genética relativa superior a 20% (Tabela 5). Dentre as possibilidades de estudos da diversidade, destacam-se a determinação das inter-relações genéticas de linhagens, a identificação de combinações parentais adequadas à obtenção de híbridos altamente heteróticos e a introgressão de genes favoráveis provenientes dos acessos de bancos de germoplasma (Reif *et al.*, 2005).

Tabela 5 - Esquema de hibridações realizadas entre combinações de variedades divergentes de milho crioulo, com base em oligonucleotídeos ISSR.

Hibridações Recíprocas					
♂	♀	Combinações	♂	♀	Combinações
(4)	(2)	Milho Preto x Colorido Vinhedo	(2)	(4)	Colorido Vinhedo x Milho Preto
(7)	(6)	Capitão Enéas 1 x Almenara 2	(6)	(7)	Almenara 2 x Capitão Enéas 1
(13)	(1)	Montes Claros 2 x Milho Branco	(4)	(1)	Milho Branco x Montes Claros 2
(14)	(6)	Montes Claros 3 x Almenara 2	(6)	(14)	Almenara 2 x Montes Claros 3
(19)	(4)	São João do Paraíso 4 x Milho Preto	(4)	(19)	Milho Preto x São João do Paraíso 4
(27)	(26)	Sabuco Fino x Branco da Barra	(26)	(27)	Branco da Barra x Sabuco Fino
(30)	(25)	Vinhedo x Asteca	(25)	(30)	Asteca x Vinhedo
(32)	(26)	Milho Coruja x Branco da Barra	(26)	(32)	Branco da Barra x Milho Coruja
(39)	(27)	São João do Paraíso 6 x Sabuco Fino	(27)	(39)	Sabuco Fino x São João do Paraíso 6

Este trabalho envolvendo diagnósticos locais, ainda que morosos e pouco céleres, permitiram recuperar preciosos genótipos de milhos crioulos, fontes de variabilidade para tolerância a estresses causados por pragas, doenças e limitações de clima, todos estes contextualizados ao semiárido. O propósito maior é de que essas sementes possam ser distribuídas e estimuladas quanto a testes comunitários, o que favorecerá o intercâmbio de sementes e surgimento de novas combinações, perspectivas de imensa relevância para a sustentabilidade dos diferentes perfis ambientais.

5. COCLUSÃO

As coleções prospectadas e caracterizadas neste trabalho possuem enormes potenciais para compor populações-base de programas de melhoramento genético, sejam eles participativos ou convencionais, sendo que os últimos geralmente padecem por bases genéticas estreitas. Com base em padrões de bandejamento eletroforético ISSR, produziu-se nove híbridos de milhos crioulos a partir de variedades com dissimilaridades genéticas superiores a 20%.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, L.; CANSI, E.; JURIATTI, C. Avaliação do rendimento sócio-econômico de variedades crioulas e híbridos comerciais de milho na microrregião de Chapecó; Revista Brasileira de Agroecologia, v. 2, n. 1, p. 1230-1233, 2007.

ANAND, K. K.; SRIVASTAVA, R. K.; CHAUDHARY, L. B.; SINGH, A. K. Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabacea) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. Taiwan, v. 55, p. 197-207, 2010.

ARAÚJO, M. R. A.; FARIAS, J. L. de S. Identificação e caracterização de recursos genéticos crioulos visando o fortalecimento da autonomia dos agricultores familiares no Semiárido cearense. Ceara: Embrapa, 2018. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190179/1/CNPC-2018-Cot171.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2022.

ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

BESPALHOK, F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Variedades Híbridas: Obtenção e Predição. In: Melhoramento de Plantas.2014. Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%2015.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2022.

BRASIL. Lei nº 11.326, de 24 de julho de 2006: Estabelece as diretrizes para a formulação da Política Nacional da Agricultura Familiar e Empreendimentos Familiares Rurais. Diário Oficial da União. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111326.htm> . Acesso em: 11 out. 2022.

BRASIL. Sérgio Vaz da Costa. Embrapa Arroz e Feijão. **Lei de proteção de cultivares**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/feijao/pos-producao/comercializacao/lei-de-protecao-de-cultivares>. Acesso em: 11 dez. 2022.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; SOUZA, A.; SILVA, D. A.; BARRETO, T. P.; GARBUGLIO, D. D.; FERREIRA, J. M. Avaliação de cultivares de milho crioulo em sistema de baixo nível tecnológico. **Acta Scientiarum**, v. 32, p. 229-233, jun. 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/asagr/a/QyXRcrGKCn7cfN5qHLJFmdM/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 10 set. 2022.

CARVALHO, V. P.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; FERREIRA, J. M.; MOREIRA, R. M. Assessment of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using inter simple

sequence repeat (ISSR) markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.2., p. 568-577, 2002.

CASU, M.; CASU D.; LAI, T.; COSSU, P.; CURINI-GALLETTI, M. Inter-simple sequence repeat markers reveal strong genetic differentiation among populations of the endangered mollusc *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) from two Sardinian marine protected areas. *Marine Biology*, 149 (5): 1163-1174, 2006.

CGIAR. Systemwide Program on Participatory Research and Gender Analysis for Technology Development and Institutional Innovation (PRGA Program). Annual Report. Cali, Colombia, 1999. 36p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. ISSN 2318 6852. Acomp. safra brasileira de grãos, Brasília, v.10 – Safra 2022/23 n.1 - Primeiro levantamento, p. 1-76 outubro 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>> Acesso Out 2022.

CORDEIRO, A. Relatório do Diagnóstico dos locais de implementação do projeto Manejo Sustentável da agrobiodiversidade nos biomas Caatinga e Cerrado. (Documento interno) 2005, 73p.

CRUZ, C. D. Programa GENES - versão Windows. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2006, 285 p.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2011, 620 p.

CURADO, Fernando Fleury; SANTOS, Amaury da Silva dos; FAGUNDES, Rita de Cássia; SILVA, Ana Cláudia de Lima; BIANCHINI, Paola Cortez. **Manejo comunitário da agrobiodiversidade: produção agroecológica de sementes de variedades crioulas por agricultores familiares**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2020. 55 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/221281/1/DOC-237-20-Embrapa-Tabuleiros-Costeiros.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2022.

DALMORA, E.; CURADO, F. F.; SANTOS, A. S.; TAVARES, E. D. Diagnóstico participativo dos guardiões de sementes crioulas de Sergipe: intercâmbios, multiplicação e troca de sementes e saberes. *Cadernos de Agroecologia*, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2018.

DANDOLINI, T. S.; SCAPIM, C. A.; 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 p. 313- 320, 2008.

DE BOEF, W. S.; THIJSEN, M. H. Ferramentas participativas no trabalho com cultivos, variedades e sementes. Um guia para profissionais que trabalham com abordagens participativas no manejo da agrobiodiversidade, no melhoramento de cultivos e no desenvolvimento do setor de sementes. Wageningen UR Centre for Development Innovation, 2007.

DOMÍNGUEZ, E.H.; GAYTÁN, M. M.; GUTIÉRREZ, A. J. U.; DOMÍNGUEZ, E. M. H. The nutraceutical value of maize (*Zea mays* L.) landraces and the determinants of its variability: A review, *Journal of Cereal Science*, Volume 103, 2022, 103399, ISSN 0733-5210, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103399>.

DOMINGUES, S. D.; NEVES, A. F.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S. Seleção de primers para análise de Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em *Cereus* sp. (Cactaceae). *Revista Biotecnologia & Ciência* v.6, n.2, p. 46-54, 2017.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15, 1990.

DUTRA, I. J. B.; MARTINS, M. C.; PARRÉ, J. L. A produção da agricultura familiar e os efeitos dos programas de incentivo. *Revista de Política Agrícola*, v. 30, p. 94, 2021.

EICHOLZ, E. D.; BEVILAQUA, G. A. P.; ANTUNES, I. F.; BERNARDI, A.; SCHIAVON, J. S.; NEUMANN, F. F. Produção de sementes e conservação de variedades de milho de polinização aberta e crioulos – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2017. 36 p. (Documentos / Embrapa Clima Temperado, ISSN 1516-8840 ; 447.

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Acompanhamento da Agricultura no Semiárido Mineiro (2019). Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br/>>. Acesso em: 12 ago.2022

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Technical Conference on Plant Genetic Resources - 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/index_en.htm> Acesso em: 12 ago.2022.

GHAZALLI, M. N.; YUNUS, M. F.; MOHAMMAD, A. L. Assessment of genetic relationships within *Bouea* (Anacardiaceae) accessions in Peninsular Malaysia using Inter

Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology, v. 14, p. 76-85, 2015.

GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V. L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. American Journal of Botany, New York, v. 96, p. 2022-2030, 2009.

GUERRA, M. P.; ROCHA, F. S.; NODARI, R. O. Biodiversidade, Recursos Genéticos Vegetais e Segurança Alimentar em um Cenário de Ameaças e Mudanças. Veiga, R.F.A. & Queiróz, M.A. (Eds.) 2015. Recursos Fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1033776/1/CapLivroRGVGuerraRochaNodari15.pdf>>. Acesso em 13 out. 2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg.html> >. Acesso em: 12 de agosto de 2022.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/index.html IBGE 2012> Acesso em: 13 out. 2022.

MACHADO, A. T.; MACHADO, C. T. T.; NASS, L. L. Manejo da diversidade genética e melhoramento participativo de milho em sistemas agroecológicos. Revista Brasileira de Agroecologia, v. 6, p. 127-136, 2011.

MACHADO, A. T.; MACHADO, C. T. T. Melhoramento participativo de cultivos no Brasil. In: BOEF, W. S.; THIJSSSEN, M. H.; OGLIARI, J. B.; STHAPIT, B. R. (eds). Biodiversidade e Agricultores: fortalecendo o manejo comunitário. Porto Alegre: L&PM, p. 93-102, 2007.

MACHADO, A. T. Manejo dos recursos genéticos vegetais em comunidades agrícolas: enfoque sobre segurança alimentar e agrobiodiversidade. In: NASS, L. L. (ed). Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 717-744, 2007.

MARTÍNEZ, J. R. P. F.; HUERTA, A. G.; LÓPEZ, D. J. P.; RONQUILLO, M. G. Caracterización fenotípica de híbridos y variedades de maíz forrajero en Valles Altos del Estado de México, México. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 2015, 6(8):1915-1927.

PRIORI, D.; BARBIERI, R. L.; CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, A.C.; VILELLA, J. C. B.; MISTURA, C.C. 2012. Caracterização molecular de variedades crioulas de abóboras com

marcadores microssatélites. *Horticultura Brasileira* 30: 499-506. *Hortic. bras.*, v. 30, n. 3, jul - set. 2012.

MUNHOZ, R. E. F.; PRIOLI, A. J.; AMARAL-JÚNIOR, A. T.; SCAPIM, C. A.; SIMON, G. A. Genetic distances between popcorn populations based on molecular markers and correlations with heterosis estimates made by diallel analysis for hybrids. *Genetics and Molecular Research*, v. 8, p. 951-962, 2009.

REIF, J. C.; HALLAUER, A. R; MELCHINGER A. E. Heterosis and heterotic patterns in maize. *Maydica*, v. 50, p. 215-223, 2005.

RIBEIRO, C. B. Caracteres que explicam a heterose na produtividade de grãos de milho. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/handle/1/486>>. Acesso em: 10 de setembro de 2022.

RIZKALLA, A. A.; ATTIA, S. A. A.; EL-HADY, E. A. A. A.; HANNA, N. S.; NASSEEF, J. E. Genetic diversity based on ISSR and protein markers associated with earliness trait in wheat. *World Applied Sciences Journal*, v. 20, p. 23-33, 2012.

SALAZAR, J. A. E.; BOSCHINI, F. C. Producción de forraje con maíz criollo y maíz híbrido. *Agron. Mesoam*. 13(1):13-17. 2002.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. 2002. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 24: 15-22.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. E. F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Labs. New York. 1989, 815 p.

SANDRI, C. A.; TOFANELLI, M. B. D. Milho crioulo: uma alternativa para rentabilidade no campo. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia GO. ISSN 1517-6398 v. 38, n. 1, p. 59-61, mar. 2008. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/pat/article/view/3629/3420>>. Acesso em: 10 de setembro de 2022.

SILVEIRA, D. C.; MONTEIRO, V. B.; TRAGNAGO, J. L.; BONETTI, L. P. Caracterização agromorfológica de variedades de milho crioulo (*Zea mays* L.) na região noroeste do Rio Grande do Sul. *Revista Ciência e Tecnologia*, Rio Grande do Sul, 1: 01-11. 2015.

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, M. S. P.; MOURA, E. F.; RODRIGUES, S. M. Seleção de primers ISSR para uso em genomas de camucamuzeiro. 17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

SIERRA, M. M.; ANDRÉS, M. P.; PALAFOX, C. A. Y MENESES, M. I. Diversidad genética, clasificación y distribución racial del maíz nativo en el estado de Puebla, México. Rev. Cienc. Nat. Agropec. 3(9):12-21. 2016.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 43, p. 843-849, 2008.

VIEIRA, F. A.; SOUSA, R. F.; SILVA, R. A. R.; FAJARDO, C. G.; MOLINA, W. F. Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v. 10, p. 525-531, 2015.

SUESS-REYES, J.; FUETSCH, E. The future of family farming: A literature review on innovative, sustainable and succession-oriented strategies. Journal of Rural Studies, Vol. 47, Part A, 2016, Pages 117-140, <<https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2016.07.008>>.

SUÁREZ, R. F.; CHÁVEZ, L. A. M.; MARISCAL, A. G. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional: Una revisión indispensable. Revista Fitotecnia Mexicana, 2013, 36(3-A), 275-283.

TERZOPOULOS, P. J.; BEBELI, P. J. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers, Field Crops Research, Volume 108, Issue 1, 2008, Pages 39-44, ISSN 0378-4290, <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.02.015>.

UNARTNGAM, J.; JANRUANG, P.; TO-ANAN, C. Genetic Diversity of Puccinia polysora in Thailand based on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analysis. Journal of Agricultural Technology 2011 Vol. 7(4): 1125-1137 Available online <http://www.ijat-aatsea.com> ISSN 1686-9141.

WANG, H-F.; ZONG, X-X.; GUAN, J-P.; YANG, T.; SUN, X-L.; MA, Y.; REDDEN, R. Genetic diversity and relationship of global faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm revealed by ISSR markers. Theor Appl Genet. 2012 Mar;124(5):789-97. doi: 10.1007/s00122-011-1750-1.