**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade genética de inhame (*Dioscorea trifida* L.) avaliada por
marcadores morfológicos, SSR e ISSR**

Wellington Ferreira do Nascimento

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

**Piracicaba
2013**

Wellington Ferreira do Nascimento
Ciências Biológicas (Licenciatura)

**Diversidade genética de inhame (*Dioscorea trifida* L.) avaliada por marcadores
morfológicos, SSR e ISSR**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2013

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

Nascimento, Wellington Ferreira do

Diversidade genética de inhame (*Dioscorea trifida* L.) avaliada por marcadores morfológicos, SSR e ISSR / Wellington Ferreira do Nascimento.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

112 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Cultura de raízes e tubérculos 2. Marcadores moleculares 3. Estrutura genética
4. Conservação in situ / on farm 5. Agricultura tradicional I. Título

CDD 635.23
N244d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Por sempre acreditarem em meu potencial,

transmitindo confiança e admiração,

dedico e ofereço esta tese aos meus pais

(José Luiz e Edilene Maria),

às minhas irmãs

(Wedja Nascimento e Widja Nascimento);

a Genildo Machado,

à Sidalva Tavares,

à Lenilda Lima

e aos meus professores

Liliane Rendall, Aureliano Guedes, Edson Silva e Luiza Sêmen, que por dádiva de Deus
também fazem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para elaboração, desenvolvimento e conclusão deste trabalho, e em especial:

A Deus, por iluminar o meu caminho e me dar forças para vencer todos os obstáculos. Apenas dessa forma consegui transformar todas as dificuldades em desejo de lutar para realizar meus sonhos.

Ao meu pai (José Luiz) e à minha mãe (Edilene Maria), que apesar de todas as dificuldades, me deram os maiores tesouros que os pais podem dar aos seus filhos: dignidade, humildade e honestidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de doutorado.

À Professora Dra. Elizabeth Ann Veasey, pela orientação, estímulo, apoio e amizade. Sem as suas brilhantes ideias, este trabalho não teria sido executado.

Ao Professor Dr. Edson Silva e à Professora Dra. Luiza Martins, pela confiança, conselhos e ensinamentos, que contribuíram para o meu crescimento intelectual e pessoal.

A todos os professores da Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, por me inserirem no meio acadêmico e científico.

A todos os professores da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos, possibilitando minha formação profissional.

À Professora Dra. Samantha Koehler, pela confiança, amizade e fornecimento de equipamentos fundamentais para realização dos experimentos.

Ao Professor Giancarlo Oliveira por disponibilizar o seu laboratório para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Professor Paul Gepts e sua esposa (Elizabeth) por permitirem a realização do meu intercâmbio na Universidade da Califórnia - UCDavis me inserindo em diferentes atividades do seu laboratório (The Crop Evolution, Domestication, and Biodiversity Lab).

A todos que compõem o Departamento de Intercâmbio da Universidade da Califórnia - UCDavis pela realização dos procedimentos diplomáticos e administrativos, em especial Baljit Nijjar, pelas orientações referentes as documentações necessárias para a efetivação na minha matrícula na UCDavis.

À doutoranda Jucelene Fernandes Rodrigues pela amizade, companheirismo, momentos de descontração e grande colaboração na execução dos experimentos.

À mestranda Mariana Novello, pela amizade, companheirismo e momentos de descontração.

Aos Doutores Thiago Mezzete e Marcos Siqueira pela amizade e companheirismo.

Ao Ronaldo Rabello pela colaboração nas atividades de campo.

Ao Marcos Cella pela colaboração nas atividades do laboratório

A todos os colegas de turma, especialmente, Thaís Paula de Souza, Wellington F.Campos e Júlio César Mistro, por participarem de um momento crucial da minha vida pessoal e profissional.

A todos que fazem parte do Laboratório de Genética Ecológica de Plantas da ESALQ-USP, especialmente Aline, Ana, Daniele, Gabriel, Nancy, Santiago, Sueme e Thaís, pela amizade.

A todos que compõem o laboratório do Paul Gepts, em especial Mayumi Acosta, Sarah Dohle, Katherine Grazer, Jorge Berny, Jan Lim, Saarah Kuzay, Paige Hamilton-Conaty, Riley Porter, Collen Spurlock, Tamara Miller, Erin Wilus.

Aos agricultores que cederam os materiais biológicos e responderam os questionários, ambos extremamente necessários para a realização dessa pesquisa.

A todos os membros que compõem a minha banca de defesa.

A todos que fazem parte da minha família, pelo apoio, confiança e admiração.

A todos os meus amigos de Piracicaba, Limeira e Rio Claro, principalmente, Anderson Chamon, Luciana Gaspar, Adriana Menini, Rafaela, Marcelo, Júnior, Altamiro, Carlos, Isaías, Ralph, Daniel e Mirella pela amizade e momentos de descontrações.

Aos meus amigos da UCDavis em especial, Daniella, Bianca, Cecília, Melôcoton, Rita, Anderson, Guilherme, Diego e Georjean Stoodt.

A todos professores e funcionários das Escolas Professor Agamenon Magalhães e Joaquim Amazonas.

E aos demais, que por intermédio da amizade acreditou em meu potencial, especialmente, Albenide, Alessandro, Anelle, Carla, César (in memorian), Celson, Cláudia, Cleide, Débora, Denise, Elbanize, Eliane, Elizângela, Fabiana, Fabiano, Fernanda, Frederico, Geórgia, Graziella, Gustavo, Iradênia, Ísis, Ísmênia, Ivanete, Kátia, Kédma, Kelliany, Larissa, Lígia, Maria José Marluce, Michel, Milena, Mônica, Roberto, Rozeane, Samir, Sandra, Socorro e Wilson.

EPIGRAFE

A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

Um homem pode imaginar coisas que são falsas,
mas ele pode somente compreender coisas que são verdadeiras,
pois se as coisas forem falsas,
a noção delas não é compreensível.

Isaac Newton

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
Referências.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Taxonomia e aspectos botânicos de <i>Dioscorea</i> spp.....	23
2.2 Importância econômica de <i>Dioscorea</i> spp.....	25
2.3 Denominações populares das espécies de <i>Dioscorea</i> no Brasil	26
2.4 Origem, dispersão e domesticação de <i>Dioscorea trifida</i> L.....	27
2.5 Agricultura tradicional e conservação dos recursos genéticos vegetais.....	28
2.6 Utilização de marcadores morfológicos na análise de diversidade genética de espécies do gênero <i>Dioscorea</i>	31
2.7 Utilização de marcadores moleculares na análise de diversidade genética de espécies do gênero <i>Dioscorea</i>	32
2.7.1 Utilização de microssatélites (Simple Sequence Repeats - SSRs) na análise de diversidade genética de espécies do gênero <i>Dioscorea</i>	33
2.7.2 Utilização de ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) na análise de diversidade genética de espécies do gênero <i>Dioscorea</i>	35
Referências.....	37
3 OBJETIVOS.....	47
3.1 Geral.....	47
3.2 Específicos.....	47
4 HIPÓTESES.....	49
5 DISTRIBUIÇÃO, MANEJO E DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DA ESPÉCIE AMEAÇADA DE INHAME AMERÍNDIO (<i>Dioscorea trifida</i> L.).....	51
Resumo.....	51
Abstract.....	51
5.1 Introdução.....	51
5.2 Material e Métodos.....	53
5.3 Resultados e Discussão	59
5.3.1 Distribuição e aspectos socioeconômicos	59

5.3.2 Diversidade morfológica e nomenclatura	63
5.4 Conclusões	67
Referências.....	68
6 DIVERSIDADE GENÉTICA ESPACIALMENTE ESTRUTURADA DO INHAME AMERÍNDIO BRASILEIRO (<i>Dioscorea trifida</i> L.) AVALIADA POR MARCADORES SSR E ISSR.....	73
Resumo.....	73
Abstract.....	73
6.1 Introdução.....	74
6.2 Material e Métodos	77
6.2.1 Extração e quantificação de DNA	77
6.2.2 Amplificação de SSR e ISSR	80
6.2.3 Análises estatísticas	82
6.3 Resultados	83
6.4 Discussão	92
6.4.1 Diversidade genética e análise comparativa entre os marcadores SSR e ISSR	92
6.4.2 Estrutura genética e desenvolvimento de estratégias de conservação.....	95
Referências.....	99
7 CONCLUSÕES.....	107
ANEXO.....	109

RESUMO

Diversidade genética de inhame (*Dioscorea trifida* L.) avaliada por marcadores morfológicos, SSR e ISSR

Dioscorea trifida L. é uma espécie de inhame comestível originária da América do Sul, que em conjunto com outras espécies importantes economicamente do gênero *Dioscorea* é mantida por pequenos agricultores tradicionais. Assim, observa-se que as comunidades tradicionais exercem um papel fundamental na manutenção e geração da diversidade genética de inhame. O objetivo deste trabalho foi obter informações a respeito da distribuição, manejo e diversidade genética de *D. trifida* no Brasil. Para tanto, foram visitados e entrevistados agricultores dos Estados de São Paulo, Santa Catarina e Mato Grosso. Durante as visitas, foram coletados 51 acessos, os quais, juntamente com dois acessos adquiridos em feiras livres no Estado do Amazonas, foram caracterizados por meio de 16 descritores morfológicos, 16 ISSR e oito SSR. Observou-se que o cultivo de *D. trifida* ocorre na maioria das vezes em roças com menos de dois hectares (92%) mantidas por agricultores tradicionais, com a produção ocorrendo em baixa escala, visando principalmente a subsistência das pessoas envolvidas com o cultivo e manutenção da espécie. Dentre as denominações encontradas para a espécie, as mais citadas foram “cará roxo”, em 43,4% das unidades amostrais, “cará” e “cará branco”, ambos observados em 9,4%, e “cará mimoso”, com 7,6%. Observou-se também uma regionalização dessas denominações, onde “cará roxo” e “cará branco” foram atribuídos à espécie pelos agricultores dos Estados de São Paulo e Mato Grosso, sendo que “cará” e “cará mimoso” foram atribuídos pelos agricultores de Santa Catarina. Os nomes “cará roxo” e “cará” foram também atribuídos aos dois acessos da Amazônia. Além dessas, várias outras denominações para a espécie foram encontradas, porém com baixa frequência. Na caracterização morfológica observou-se que as cores da casca e da polpa foram os caracteres morfológicos mais relevantes para a distinção dos acessos. O nível de polimorfismo entre os acessos foi elevado, 95% para SSR e 76% para ISSR. O coeficiente de similaridade de Jaccard, bem como os resultados obtidos com as análises de agrupamento, coordenadas principais e bayesiana para os marcadores SSR e ISSR, separaram os acessos em três grupos principais: I – acessos de Ubatuba-SP; II – acessos de Iguape-SP e Santa Catarina; III - acessos de Mato Grosso. Os dois acessos do Amazonas variaram de posição de acordo com a região genômica analisada. A maior parte da diversidade genética foi observada dentro dos grupos formados (66,5% e 60,6% para ISSR and SSR, respectivamente), embora a diversidade entre grupos tenha sido de considerável magnitude, mostrando a estruturação dos acessos de acordo com sua origem, o que foi comprovado pela correlação baixa, mas significativa entre as distâncias genéticas e geográficas dos acessos. Portanto, os resultados obtidos para os marcadores SSR e ISSR demonstraram que a diversidade genética dos acessos de *D. trifida* mantidos por pequenos agricultores tradicionais do Brasil está levemente estruturada no espaço geográfico amostrado. Estes resultados poderão auxiliar na elaboração de estratégias de conservação para a espécie, tanto *ex situ* como *in situ*, dentro da visão de conservação *on farm*.

Palavras-chave: Cultura de raízes e tubérculos; Marcadores moleculares; Estrutura genética; Conservação *in situ* / *on farm*; Agricultura tradicional

ABSTRACT

Genetic diversity of yam (*Dioscorea trifida* L.) assessed with morphological, SSR and ISSR markers

Dioscorea trifida L. is a species of edible yams originated in South America, which together with other economically important species of the genus *Dioscorea* is cultivated by small traditional farmers. Thus, it is observed that traditional communities play a key role in the generation and maintenance of yams genetic diversity. The aim of this study was to obtain information about the distribution, management and genetic diversity of *D. trifida* in Brazil. So, were visited and interviewed farmers in the states of São Paulo, Santa Catarina and Mato Grosso. During the visits, we collected 51 accessions, which, together with two accessions purchased at fairs in the state of Amazonas, were characterized using 16 morphological descriptors, 16 ISSR and eight SSR markers. We observed that *D. trifida* occurs most often in swidden fields with less than two hectares (92%) maintained by traditional farmers, with production occurring on a small scale, mainly targeting the livelihood of the people involved with the cultivation and maintenance of the species. Among the names found for the species, the most cited were "cará roxo" in 43.4% of the sample units, "cará" and "cará branco", both observed in 9.4% and "cará mimoso" with 7.6%. There is also a regionalization of these denominations, where "inhame roxo" and "inhame branco" were assigned by farmers to the species in the states of São Paulo and Mato Grosso, where "cará" and "cará mimoso" were allocated to farmers of Santa Catarina. The names "cará roxo" and "cará" were also awarded to two accessions from the Amazon. Besides these, several other names for the species were found, but with low frequency. In the morphological characterization, the skin and flesh color were the most relevant traits for the distinction of accessions. The polymorphism level between the accessions was high, 95% for SSR and 76% for ISSR. The Jaccard similarity coefficient and the results obtained in the cluster analysis, principal coordinates and Bayesian analyses for ISSR and SSR markers, separated the accessions into three main groups: I - accessions from Ubatuba-SP; II - accessions from Iguape-SP and Santa Catarina; III - accessions from Mato Grosso. The accessions from Amazonas ranged their position according to the genomic region analyzed. The majority of genetic diversity was observed within groups (66.5% and 60.6% for ISSR and SSR, respectively), although differences between groups was of considerable magnitude, showing the structure of the accessions according to their origin, which was confirmed by correlation between genetic and geographic distances of accessions. Therefore, the results obtained for the SSR and ISSR markers showed that the genetic diversity of accessions of *D. trifida* maintained by small traditional farmers in Brazil is slightly structured in the geographic area sampled. These results may help in developing conservation strategies for the species, both *ex situ* and *in situ*, within the vision of *on farm* conservation.

Keywords: Root and tuber crops; Molecular markers; Genetic structure; *In situ/on farm* conservation; Traditional agriculture

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A) Planta de *Dioscorea trifida* L.; B) Inflorescências; C) Caule alado; D) Folhas palmadas; E) Tubérculos subterrâneos24
- Figura 2 - Locais de coleta de *Dioscorea trifida* L. no Brasil55
- Figura 3 - Desenvolvimento das plantas de *Dioscorea trifida* L. em casa de vegetação (A) e vista parcial do experimento após transplântio dos acessos (B) para o banco de germoplasma de inhame do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP.....56
- Figura 4 - Aspectos morfológicos das folhas e túberas dos acessos de *Dioscorea trifida* L. coletados no Brasil. A) Folhas com três lóbulos; B) Folhas com cinco lóbulos; C) túberas com polpa branca; D) túberas com polpa roxa e branca; E) túberas com polpa roxa.....66
- Figura 5 - Frequências para cor da casca e polpa das túberas dos acessos avaliados de *Dioscorea trifida* L..67
- Figura 6 - Locais de coleta de *Diocorea trifida* L. no Brasil.....78
- Figura 7 - Dendrograma obtido a partir dos dados de SSR demonstrando a relação genética entre 53 acessos de *Dioscorea trifida* L.: grupo I [acessos de Ubatuba-SP (verde)]; grupo II [acessos de Iguape-SP (azul), Santa Catarina (rosa) e Amazonas (amarelo)]; e grupo III [acessos do Mato Grosso (vermelho)]87
- Figura 8 - Dendrograma obtido a partir dos dados de ISSR demonstrando a relação genética entre 53 acessos de *Dioscorea trifida* L.: grupo I [acessos de Ubatuba-SP (verde)]; grupo II [acessos de Iguape-SP (azul) e Santa Catarina (rosa)]; grupo III [acessos do Mato Grosso (vermelho)] e grupo IV [acessos do Amazonas (amarelo)]88
- Figura 9 - Gráfico de dispersão das duas primeiras coordenadas principais responsáveis por 35,67% da variação total entre 53 acessos de *Dioscorea trifida* L. avaliados por marcadores SSR, demonstrando a formação de três grupos principais: grupo I (acessos provenientes de Ubatuba-SP); grupo II (acessos provenientes de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas); e grupo III (acessos provenientes do Mato Grosso)89
- Figura 10 - Gráfico de dispersão das duas primeiras coordenadas principais responsáveis por 31,65% da variação total entre 53 acessos de *Dioscorea trifida* L. avaliados por marcadores ISSR, demonstrando a formação de três grupos principais: grupo I (acessos provenientes Ubatuba-SP); grupo II (acessos provenientes de Iguape-SP

e Santa Catarina); grupo III (acessos provenientes do Mato Grosso); e grupo IV (acessos provenientes do Amazonas).....89

Figura 11 - Estrutura da diversidade genética de 53 acessos de *Dioscorea trifida* L. com base na análise Bayesiana para oito marcadores de SSR. Cada acesso está representado por uma barra vertical. Os acessos de 1 a 20 são provenientes de Ubatuba-SP; acessos de 21 a 39 são provenientes de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas; e os acessos de 40 a 53 são provenientes do Mato Grosso.....91

Figura 12 - Estrutura da diversidade genética de 53 acessos de *Dioscorea trifida* L. com base na análise Bayesiana para 16 marcadores de ISSR. Cada acesso está representado por uma barra vertical. Os acessos de 1 a 20 são provenientes de Ubatuba-SP; acessos de 21 a 39 são provenientes de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas; e os acessos de 40 a 53 são provenientes do Mato Grosso.....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Acessos de <i>Dioscorea trifida</i> L. coletados no Brasil	57
Tabela 2 - Descritores morfológicos utilizados para caracterização dos acessos de <i>Dioscorea trifida</i> L. accessions coletados no Brasil.....	59
Tabela 3 - Nomes populares para <i>Dioscorea trifida</i> L. dado pelos agricultores dos Estados do Mato Grosso, Santa Catarina, São Paulo e Amazonas, Brasil	64
Tabela 4 - Valores máximo e mínimo, média e desvio padrão das características quantitativas avaliadas em <i>Dioscorea trifida</i> L.....	65
Tabela 5 - Acessos de <i>Dioscorea trifida</i> L. utilizados neste estudo, incluindo número de identificação dos acessos (ID) no Banco de germoplasma, procedência, nome popular e coordenadas geográficas.....	79
Tabela 6 - Primers de SSR utilizados para avaliar 53 acessos de <i>Dioscorea trifida</i> L., incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_A), variação do tamanho das bandas de SSR em pares de base (pb), número de bandas (N_B), número de bandas polimórficas (N_{BP}), porcentagem de polimorfismo (P) e poder de discriminação (D).....	85
Tabela 7 - Primers de ISSR utilizados para avaliar 53 acessos de <i>Dioscorea trifida</i> L., incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_A), variação do tamanho das bandas de SSR em pares de base (pb), número de bandas (N_B), número de bandas polimórficas (N_{BP}), porcentagem de polimorfismo (P) e poder de discriminação (D).....	85
Tabela 8 - Análise de variância molecular (AMOVA) para 53 acessos de <i>Dioscorea trifida</i> L. considerando três grupos, de acordo com a análise bayesiana com o software Structure: grupo I (acessos de Ubatuba-SP), grupoII (acessos de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas), e grupoIII (acessos de Mato Grosso)	91
Tabela 9 - Índice de diversidade de Shannon (H') dos acessos de <i>Dioscorea trifida</i> L. por Estado e de acordo com os grupos formados a partir da análise Bayesiana com o software Structure: grupo I (acessos de Ubatuba-SP), grupoII (acessos de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas), e grupoIII (acessos do Mato Grosso.....	91

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As denominações populares “inhame” e “cará” são utilizadas para um grupo de plantas tuberosas, pertencentes à família Dioscoreaceae e ao gênero *Dioscorea*, que por sua vez é formado por mais de 600 espécies, das quais apenas 10 são utilizadas no consumo humano (LEBOT, 2009).

No Brasil, as dioscóreas mais importantes economicamente são *D. alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. rotundata* Poir., *D. bulbifera* L. e *D. trifida* L. (PEDRALLI, 1998; VEASEY et al., 2010). Estas se originaram em áreas tropicais da África (*D. cayenensis* e *D. rotundata*), Ásia (*D. alata* e *D. bulbifera*) e América do Sul (*D. trifida*) (COURSEY, 1976).

Embora *D. trifida* seja a única espécie de inhame importante economicamente originária da América do Sul e ocorra com grande frequência na região do Caribe e floresta Amazônica, seu ancestral selvagem ainda não foi identificado e sua domesticação é mal documentada com poucos registros sobre a verdadeira história evolutiva da espécie (BOUSALEM et al., 2010). Entretanto, segundo Pedralli (1998), esta espécie originou-se em áreas localizadas na fronteira entre Brasil, Guiana, Suriname e Guiana Francesa, sendo domesticada pelos povos indígenas dessas regiões. No Brasil, *D. trifida* é atualmente encontrada nas florestas pluviais tropicais, cerrados do planalto central, campos rupestres da Serra do Espinhaço e florestas estacionais adjacentes a estes campos (PEDRALLI, 2002). Seu cultivo tem sido realizado principalmente por pequenos agricultores rurais, com aumento expressivo no século XXI (PEDRALLI, 1998).

Quanto aos aspectos botânicos, *D. trifida* é uma planta perene e dióica com grande controvérsia em relação ao número de cromossomos. Diferentes níveis de ploidia foram reportados para a espécie, tais como, $2x=18$ (diplóide), $4x=36$ (tetraplóide) e $6x=54$ (hexaplóide) (MARTIN; DEGRAS, 1978). No entanto, um estudo mais recente, realizado por Bousalem et al. (2006), evidenciou um nível de ploidia de $2n=4x=80$, considerando então que a espécie é autotetraplóide.

Suas túberas possuem alta qualidade nutritiva e apresentam, na sua composição, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas, bem como propriedades antimicrobianas, diuréticas e energizantes, o que permite seu uso no combate à desnutrição, diabetes e redução de colesterol (RAMOS-ESCUADERO et al., 2010). Apesar de suas túberas serem bastante utilizadas na culinária brasileira, *D. trifida* não tem sido muito utilizada para o cultivo comercial em grande escala, esta espécie seja comercializada nos mercados de alguns estados

brasileiros, como Amazonas, São Paulo, Santa Catarina e Mato Grosso (VEASEY et al., 2010).

Por serem amplamente utilizadas em pequenas propriedades rurais, o inhame é cultivado por agricultores tradicionais, que geram e mantêm a diversidade genética em suas roças e quintais, não apenas das espécies de inhame, mas de outras plantas de propagação vegetativa, como mandioca, batata e batata-doce (SIQUEIRA, 2011). Entretanto, as pressões socioeconômicas sofridas por esses agricultores propiciam a perda de diversidade dos recursos genéticos vegetais, e neste caso, da diversidade dessas espécies. Neste contexto, observa-se a necessidade de estudos para verificar os danos causados por essas pressões à cultura do inhame e elaborar estratégias de conservação e manutenção da diversidade da mesma.

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de DNA, além de marcadores morfológicos. Dentre essas técnicas os marcadores baseados na amplificação de sequências simples repetidas ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), também denominados de microssatélites, são bastante eficientes (OLIVEIRA et al., 2006). Estes marcadores são codominantes, multialélicos e altamente polimórficos, além de apresentar reprodutibilidade satisfatória, grande poder de resolução e baixo custo (CAIXETA et al., 2009). Outro marcador bastante eficiente e utilizado em estudos de diversidade genética de populações de plantas naturais e cultivadas é o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), que representa uma das classes de marcadores moleculares mais recentes e foi desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994; CAIXETA et al., 2009). São marcadores dominantes, facilmente detectados, bastante variáveis, multialélicos, com alto padrão polimórfico, e fornecem grande número de dados por um custo razoável (WOLFE, 2005).

No Brasil, ainda são poucas as instituições atualmente envolvidas com pesquisas relacionadas à cultura do inhame (CARMO, 2002), principalmente em relação à espécie *D. trifida*, de modo que quaisquer novos estudos com esta cultura são importantes em termos de novos conhecimentos, podendo ser úteis para programas de melhoramento e estratégias de conservação, tanto *ex situ*, em bancos de germoplasma, como *in situ*, dentro da visão de conservação *in situ* na propriedade rural, conhecida como conservação *on farm*.

Referências

- BOUSALEM, M.; ARNAU, G.; HOCHU, I.; ARNOLIN, R.; VIADER, V.; SANTONI, S.; DAVID, J. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the *Dioscorea*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, n. 3, p. 439-451, 2006.
- BOUSALEM, M.; VIADER, V.; MARIAC, C.; GOMEZ, R.; HOCHU, I.; SANTONI, S.; DAVID, J. Evidence of diploidy in the wild Ameridian yam, a putative progenitor of the endangered species *Dioscorea trifida* (Dioscoreaceae). **Genome**, Ottawa, v. 53, n. 5, p. 371-383, 2010.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 371-442.
- CARMO, C.A.S. **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória: INCAPER, 2002. 289 p.
- COURSEY, D.G. The origin and domestication of yams in Africa. In: HARLAN, J.R.; De WET, J.M.J.; STEMLER MOUTON, A.B.L. (Ed.). **Origin of African plant domestication**. Amsterdam: Mouton Hague, 1976. p. 383-408.
- LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids**. London: CABI, 2009. 413 p.
- MARTIN, F.W.; DEGRAS, L. Tropical yams and their potential: minor cultivated *Dioscorea* species. **Scientific Reports of the Faculty of Agriculture**, Okayama, v. 72, p. 19-26, 1978.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.
- PEDRALLI, G.. **Revisão taxonômica das espécies de Dioscoreaceae (R.Br.) Lindley da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil**. 1998. 400 p. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- _____. Distribuição geográfica e taxonomia das famílias Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. In: CARMO, C.A.S. (Ed.). **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória: INCAPER, 2002. p. 15-26.
- RAMOS-ESCUADERO, F.; SANTOS-BUELGA, C.; PÉREZ-ALONSO, J.J.; YÁÑES, J.A.; DUEÑAS, M. HPLC-DAD-ESI/MS identification of anthocyanins in *Dioscorea trifida* L. yam tuber (purple sachapapa). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, p. 745-752, 2010.
- SIQUEIRA, M.V.B.M. Yam: aneglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 6-20, 2011.

VEASEY, E.A.; SIQUEIRA, M.V.B. M.; SILVA, L.R.G.; NASCIMENTO, W.F.; FERREIRA, A.B.; SILVA, D.; SILVA, E.; MING, L.C.; PERONI, N.; SANTOS, A.H. Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas brasileiros. In: KFFURI, C.W.; AMOROZO, M.C.M.; MING, L.C. (Org.). **Agrobiodiversidade no Brasil**: experiências e caminhos da pesquisa. Recife: NUPEEA, 2010. p. 45-74.

WOLFE, A.D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzimology**, Welwyn, v. 395, p. 134-144, 2005.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (ssr)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Taxonomia e aspectos botânicos de *Dioscorea* spp.

O gênero *Dioscorea* pertencente à família Dioscoreaceae é composto por 644 espécies (GOVAERTS et al., 2007). Este gênero encontra-se dividido em várias seções, sendo as espécies de maior importância econômica agrupadas em apenas cinco: *Enantiophyllum* (*D. alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. mummularia* Lam., *D. opposita* Thunb., *D. rotundata* Poir. e *D. transversa* L.), *Combilium* (*D. esculenta* Lour.), *Opsophyton* (*D. bulbifera* L.), *Lasiophyton* (*D. pentaphylla* L.) e *Macrogynodium* (*D. trifida* L.) (LEBOT, 2009). Assim como outras espécies de inhame, *D. trifida* apresenta várias denominações populares, dentre essas: 'cushcush' em Trinidad e Índia ocidental, "yampi" na Jamaica, "aja" em Cuba, "Maona" no Peru, "mapuey" em Porto Rico e "cará", "cará doce", "cará mimoso", "cará roxo", "cará branco", "cará pão" e "cará cobrinha" no Brasil (BRESSAN et al., 2005; STEPHENS, 2009; VEASEY et al., 2010).

O inhame de um modo geral é uma planta trepadeira, de porte herbáceo e caules subterrâneos do tipo tubérculo, responsável pelo armazenamento de substâncias na planta e sua propagação vegetativa (PEDRALLI, 1998). *D. trifida* (Figura 1) é uma planta perene com tubérculos subterrâneos medindo de 20-40 cm de comprimento, com polpa variando de branca, amarela, rosa a púrpura, e todas possuem um aroma agradável (LEBOT, 2009). O caule é quadrangular, alado e sem espinhos, tendo as folhas palmadas, profundamente lobuladas, alternadas e raramente opostas (MONTALDO, 1991). Quanto ao seu sistema reprodutivo, apresenta predominância de alogamia. As plantas são dióicas, com flores pequenas e frutos capsulados não comestíveis (STEPHENS, 2009), entretanto, na maioria das vezes, sua propagação é feita vegetativamente por meio de tubérculos (MONTALDO, 1991; SECRETARIA DE AGRICULTURA-SEAGRI, 2002).

Investigações de acessos de germoplasma cultivados na Guiana Francesa sugerem fortemente que *D. trifida* é uma espécie autotetraplóide (BOUSALEM et al., 2006), com $2n=4x=80$ cromossomos e número de cromossomo básico de $x=20$, como observado em estudos recentes com o inhame africano *D. rotundata* (SCARCELLI et al., 2005) e o asiático *D. alata* (ARNAU et al., 2009).

Figura 1 - A) Planta de *Dioscorea trifida* L.; B) Inflorescências; C) Caule alado; D) Folhas palmadas; E) Tubérculos subterrâneos. Fotos do autor

A cultura do inhame é resistente à seca e pouco exigente quanto ao tipo de solo e adubação, dispensando a aplicação de fungicida e inseticida, bem como renovação periódica de sementes (MURAYAMA, 1999). Entretanto, desenvolve-se bem em solos de textura arenosa, bem drenados e arejados, férteis e ricos em matéria orgânica, com pH de 5,5 a 6,0 (SANTOS et al., 2006). Quando em condições edafoclimáticas favoráveis, o ciclo completo da cultura pode variar de 6 a 12 meses e o período adequado para o agricultor efetuar a colheita é de 3 a 4 semanas após o ressecamento dos ramos, tempo necessário para os tubérculos apresentarem tamanho e aspecto favoráveis ao consumo (ZARATE et al., 1996).

O principal fator limitante para o desenvolvimento de *D. trifida* é o potyvirus (gênero *Potyvirus*, família Potviridae), que ocasiona uma variedade de sintomas nas folhas das plantas infectadas afetando o crescimento da planta (ODU et al., 2004). Este patógeno está diretamente relacionado com a erosão genética da cultura (BOUSALEM et al., 2010).

2.2 Importância econômica de *Dioscorea* spp.

Apesar do escasso conhecimento sobre as dioscoreáceas, cerca de 25 espécies são utilizadas na alimentação humana, 15 possuem propriedades medicinais e seis são utilizadas como plantas ornamentais (PEDRALI, 1998). As túberas de inhame, amplamente utilizadas na agricultura tradicional, possuem alta qualidade nutritiva e apresentam na sua composição química, carboidratos, proteínas, sais minerais (cálcio, ferro e fósforo) e vitaminas (A, C, D e complexo B). É um alimento de fácil digestibilidade e dispõe de propriedades medicinais que garantem seu uso na farmacologia, principalmente na síntese de cortisona e outros hormônios esteróides (CHU; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1991; MESQUITA, 2002). Além disso, a planta tem potencial para ser utilizada na fabricação de amido, bem como nas indústrias alimentícias e de cosméticos (AYENSU; COURSEY, 1972).

Segundo a FAOSTAT (2013), a produção mundial de inhame em 2011 foi de aproximadamente 56,6 milhões de toneladas. Mais de 96% desta produção é proveniente da África, sendo Nigéria, Ghana, Costa do Marfim e Benin os países responsáveis por mais de 49 milhões de toneladas/ano. O Brasil ocupa a 14ª posição no ranking mundial, com 244.142 toneladas/ano (FAO, 2013), sendo os Estados da Paraíba e de Pernambuco os maiores produtores com 55.341 t e 49.500 t, respectivamente (SANTOS; MACEDO, 2002). No Estado de São Paulo, as principais regiões produtoras, responsáveis por 90% da produção, são: Campinas, Mogi Mirim e São José do Rio Preto (MONTEIRO, 2002).

No Brasil, as principais espécies cultivadas são *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. bulbifera*, *D. dumetorum*, *D. laxiflora*, *D. microbotrya* e *D. trifida* (PEDRALI, 1998). *Dioscorea dodecaneura*, *D. amaranthoides*, *D. bulbifera* e *D. trifida* são cultivadas em vários estados para fins ornamentais, bem como alimentícios. As espécies tóxicas são utilizadas pelos indígenas das Regiões Centro-Oeste e Norte (Xavante, Borore, Pacaas Novos, Surui, Cinta Larga, Karaja) para envenenar flechas, na pesca e caça (PEDRALI, 1998).

Apesar das principais espécies cultivadas no Brasil serem de origem africana e asiática, observa-se que *D. trifida* ainda é bastante cultivada, principalmente na região sudeste, com destaque para o Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. Esta região, segundo Bressan et al. (2005) é muito importante ao que se refere à diversidade manejada da cultura do inhame, por apresentar quatro diferentes espécies de *Dioscorea* (*D. trifida*, *D. cayenensis*, *D. alata* e *D. bulbifera*). Estas são cultivadas e mantidas por agricultores tradicionais capazes de gerar e manter a diversidade genética em roças e quintais, não apenas dessas espécies, mas de outras plantas cultivadas.

2.3 Denominações populares das espécies de *Dioscorea* no Brasil

No Brasil, durante muitas décadas, os nomes populares do inhame e cará vêm causando grande confusão. Nos Estados da Paraíba e Pernambuco é comum denominar de inhame as espécies de *Dioscorea* que produzem túberas grandes, e de cará as espécies que produzem túberas pequenas. Pelo nome vulgar de inhame são conhecidas equivocadamente várias espécies de plantas pertencentes à família das Aráceas, mas em outros países, mesmo das Américas, é empregado para diversas espécies da família das Dioscoreáceas, em lugar de cará (SANTOS et al., 2007).

Em algumas regiões do País também chamam erroneamente de inhame o rizoma de uma espécie da família Araceae, conhecido como “taro” (*Colocasia esculenta*), gerando confusão entre os técnicos, produtores e consumidores (CEREDA, 2000). Inclusive, muitas das informações técnicas, como as estatísticas de produção e custo, também foram misturadas.

A origem de muitos nomes vulgares das espécies muitas vezes é obscura, ou mesmo impossível de ser identificada, em especial aqueles que acompanham as plantas cultivadas, que foram domesticadas e levadas dos seus locais de origem e/ou cultivo inicial, referenciados pelos seus nomes populares há séculos, utilizando-se, geralmente, algum atributo morfológico, referência ao uso, local ou indicação de ordem muito pessoal (PEDRALLI, 2002). Assim, os nomes populares variam de local para local, podendo uma planta ter diversas denominações e uma denominação ser comum para diversas plantas. Por esta razão é imprescindível conhecer o nome científico de cada espécie, conforme previsto no “Código Internacional de Nomenclatura Botânica” (GREUTER et al., 1994).

Observa-se que o nome popular de inhame (igname, ñame ou yam) é dado em todos os idiomas ao gênero *Dioscorea*, enquanto que apenas em algumas regiões do Brasil, compreendendo São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santos, este mesmo gênero é denominado de cará.

Para contornar a confusão do equívoco de nomes populares das espécies de *Dioscorea*, durante o I Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Cará, foram propostas e aprovadas, em Assembleia Geral, a denominação “inhame” para todas as espécies de *Dioscorea*, padronizando e uniformizando os termos brasileiros com a denominação internacional (PEDRALLI, 2002; CEREDA, 2002). A padronização dos nomes populares para as espécies de Dioscoreaceae discutida na Assembleia Geral do I Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Cará, trouxe um melhor entendimento para os pesquisadores, produtores, comerciantes e consumidores, facilitando a identificação das espécies cultivadas do gênero *Dioscorea*.

2.4 Origem, dispersão e domesticação de *Dioscorea trifida* L.

As espécies do gênero *Dioscorea* originaram-se no Sudeste da Ásia (*D. esculenta*, *D. alata* e *D. bulbifera*), Oeste da África (*D. altissima*, *D. rotundata*, *D. dumetorum* e *D. cayenensis*) e América Tropical (*D. trifida*). Essas regiões são consideradas centros de diversidade e domesticação da cultura (ASIEDU et al., 1997, citado por TAMIRU et al., 2007), que atualmente apresenta grande dispersão entre os continentes, sendo encontrada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (MONTALDO, 1991; SEAGRI, 2002). Segundo Coursey (1976), também citado por Tamiru et al. (2007), o gênero teve uma dispersão mundial ampla no final do Período Cretáceo e mais tarde durante o Mioceno, tendo evoluído em diferentes direções no Novo e Velho Mundo, originando assim espécies distintas.

D. trifida foi certamente a primeira espécie de inhame cultivada pelos primeiros imigrantes europeus e africanos na Amazônia (LEBOT, 2009; BOUSALÉM et al., 2010), mas pouco se sabe sobre onde e quando foi domesticada. Embora bastante cultivada pelos povos indígenas e outras populações tradicionais, seu ancestral selvagem ainda não foi identificado e sua domesticação é mal documentada. Apenas sabe-se que durante a época pré-colombiana, muitas espécies de dioscoreáceas fizeram parte da dieta indígena (PEDRALLI, 1990).

A compreensão da origem e da domesticação de *D. trifida* exige a exploração da diversidade de formas selvagens para verificar seu parental selvagem mais próximo. Essas espécies selvagens podem ser importantes como fontes de genes que conferem características de interesse, incluindo resistência ao potyvírus, que pode ser usado para melhorar as variedades existentes. Recentemente, acessos de *D. trifida* selvagens foram identificados na Guiana Francesa (BOUSALEM et al., 2010), mas nenhuma investigação molecular havia sido ainda realizada para verificar as relações entre estes acessos, possivelmente selvagens e as formas cultivadas.

Com o intuito de contribuir com a compreensão da origem e evolução de *D. trifida*, Bousalem et al. (2010) caracterizaram o status citogenético dos acessos da Guiana Francesa por contagem de cromossomos, citometria de fluxo e análise do padrão de microssatélites e documentaram a relação genética de acessos selvagens de *D. trifida* com acessos cultivados através do polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP). Os resultados mostraram a existência de um parental selvagem para *D. trifida*, bem como a diploidia ($2n=40$) de parentais silvestres. Na região costeira, onde as formas cultivadas e silvestres são simpátricas, citótipos tetraplóides e triplóides coexistem nas mesmas populações. Nos locais em que as formas cultivadas e silvestres são alopátricas, o nível diplóide selvagem predomina. A análise de AFLP contribuiu para a ideia inicial da posição das formas selvagens em relação às formas

cultivadas. Todos os tipos selvagens e cultivados formaram um grupo monofilético estruturado em dois grandes subgrupos correspondentes ao citótipo tetraplóide da forma cultivada e ao nível diplóide para a forma selvagem. Os citótipos triplóides da forma selvagem ficaram numa posição intermediária. Acessos silvestres ficaram agrupados com base na sua origem geográfica. Os dados apresentados neste trabalho se mostraram significativos para a conservação, melhoramento, estudo de diversidade e estrutura populacional de *D. trifida*, permitindo uma melhor compreensão da evolução e domesticação da espécie.

2.5 Agricultura tradicional e conservação dos recursos genéticos vegetais

As comunidades “tradicionais” são aquelas que apresentam um modelo sustentável de ocupação do espaço e uso dos recursos naturais, derivado de conhecimentos transmitidos ao longo das gerações e voltados principalmente para a subsistência. Normalmente, apresentam baixa articulação com mercado, uso intensivo de mão de obra familiar e tecnologias de baixo impacto ambiental (DIEGUES; ARRUDA, 2001).

Estas comunidades são provenientes da miscigenação entre colonizadores europeus, populações indígenas e escravos, como: os caiçaras, no litoral brasileiro; açorianos no litoral catarinense e rio-grandense; babaçueiros, na região Meio-Norte (Goiás, Tocantins, Maranhão e Piauí); caboclos/ribeirinhos amazônicos, na Floresta Amazônica; caipiras/sitiantes, no Sudoeste e Centro-oeste brasileiro; campeiros (pastoreios), nos pampas e coxilhas, no Rio Grande do Sul; jangadeiros, na faixa costeira do Ceará e no Sul da Bahia; pantaneiros, no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul; pescadores artesanais, no litoral e margens dos rios e lagos; praiheiros, na faixa litorânea amazônica entre Piauí e Amapá; os quilombolas, que são descendentes de escravos negros; sertanejos/vaqueiros, no agreste e regiões semiáridas do Nordeste; e os varzeiros (ribeirinhos não amazônicos), nas margens do Rio São Francisco (DIEGUES; ARRUDA, 2001). Em geral esses povos ocupam a região há muito tempo e na maioria das vezes não tem registro legal de propriedade privada individual da terra, definindo apenas o local de moradia como parcela individual, sendo o restante do território encarado como área de utilização comunitária, com seu uso regulamentado pelos costumes e normas compartilhadas internamente (ARRUDA, 1999).

Há diversos sistemas agrícolas praticados pelas comunidades tradicionais, entre eles: a agricultura praticada em “quintais”, área localizada ao redor da própria residência; e a agricultura itinerante, conhecida também como agricultura de derrubada e queima, ou de pousio, que tem a “roça” como unidade básica evolutiva. Tanto os quintais como as roças,

apresentam associação de diferentes espécies de plantas e singularidade em sua história cultural (DENEVAN, 2001). Estes tipos de agricultura representam, portanto, uma importante fonte de conservação dos recursos genéticos vegetais, mais especificamente da agrobiodiversidade, pois são várias as espécies cultivadas numa mesma área e que estão sendo mantidas por esses agricultores ao longo do tempo (PERONI; HANAZAKI, 2002).

Como os recursos genéticos vegetais são considerados a base de subsistência da humanidade e um patrimônio de valor incalculável com potencial para resolver problemas como a fome e a pobreza, a sua perda é um processo irreversível que compromete a segurança alimentar local e mundial (JARAMILLO; BAENA, 2000). Neste contexto, a conservação dos recursos genéticos vegetais representa um dos maiores desafios deste século, pois o elevado nível de perturbações antrópicas que vem ocorrendo nas últimas décadas põe em risco tanto os ecossistemas naturais como os agroecossistemas (VIANA; PINHEIRO, 1998).

O ser humano, em função da redução do número de espécies cultivadas capazes de fornecer alimento imediato com baixo custo e do plantio extensivo das mesmas, tem destruído muitas regiões de vegetação natural para cultivar apenas aquelas espécies de interesse, bem como substituído variedades locais por outras que reúnem uma maior combinação de características agromorfológicas desejáveis. Este processo tem ocasionado uma uniformização do material genético contido nas plantas cultivadas mantidas ao longo do tempo pelos agricultores. Assim, a uniformidade genética das espécies agrícolas imposta pela modernização da agricultura ocasiona a perda de variedades locais e de importantes fontes de genes responsáveis pela resistência e/ou tolerância a vários fatores bióticos e abióticos, tais como à seca, à umidade excessiva do ar, ao calor, ao frio ou ainda, às pragas e às doenças, entre outras (PERONI; MARTINS, 2000). Ainda, as variedades locais apresentam o nível máximo de adaptação aos ambientes onde foram desenvolvidas, apresentando variação de características agronômicas bastante interessantes (EMBRAPA, 1999).

Com o intuito de lançar estratégias de conservação dos recursos genéticos e principalmente da agrobiodiversidade, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) criou as bases para a formação do *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), atualmente denominado Biodiversity International. Esta organização utiliza a biodiversidade agrícola para melhorar a qualidade de vida das pessoas, realizando pesquisas globais com base em três desafios principais: agricultura sustentável, nutrição e conservação (FAO, 2013). Com intuito semelhante, também merece destaque o evento intitulado “A Conservação da Diversidade Biológica”, realizado em 1992, no Rio de Janeiro, pois este criou um novo marco na conservação dos recursos genéticos vegetais ao nível mundial por

reafirmar a importâncias dos recursos vegetais utilizados por pequenos agricultores. Assim, observa-se uma maior atenção da população global para a importância do uso, manutenção e conservação dos recursos genéticos, em especial de variedades locais (UTERMOEHL; GONÇALVES, 2007).

Existem duas estratégias para a conservação dos recursos genéticos vegetais: a conservação *ex situ* e *in situ*. A conservação *ex situ* é aquela que ocorre fora do habitat natural da espécie, enquanto que *in situ* refere-se à conservação do ecossistema e do habitat natural, e no caso das espécies domesticadas, do local onde essas desenvolveram as suas características adaptativas, denominado “sistemas agrícolas tradicionais”. Portanto, dentro da definição de conservação *in situ*, encontram-se dois conceitos: conservação genética em reservas e conservação *on farm*. O primeiro inclui o manejo e monitoramento de populações silvestres em áreas definidas para conservação ativa e em longo prazo. Com relação à conservação *on farm*, esta permite a conservação dos processos evolutivos e de adaptação que ocorreram durante o manejo de plantas no sistema de cultivo realizado por populações tradicionais (JARVIS et al., 2000), gerando elevada diversidade inter e intra específica das espécies cultivadas (PERONI; MARTINS, 2000), sendo uma estratégia complementar à conservação *ex situ* (CLEMENTE et al., 2008).

Além da grande diversidade genética interespecífica presente nesses sistemas agrícolas, como mencionado acima, é grande a diversidade genética intraespecífica gerada e encontrada na agricultura tradicional. Diversos estudos com variedades locais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de diversas regiões do Brasil, principalmente São Paulo, Amazonas, Minas Gerais e, mais recentemente, do nordeste do Mato Grosso do Sul, têm mostrado o potencial deste tipo de agricultura na manutenção da diversidade genética para esta cultura (PERONI et al., 1999, 2007; FARALDO et al., 2000; MÜHLEN et al., 2000; CURY, 2005; SIQUEIRA et al., 2009, 2010). Esses trabalhos acumularam um grande conhecimento a respeito da ecologia e genética de populações de mandioca submetida a sistemas de agricultura tradicional, e permitiram o estabelecimento de um modelo explicativo bastante avançado da dinâmica evolutiva desta cultura. Estudos nesta linha de pesquisa têm sido conduzidos com outras espécies de raízes e tubérculos, como a batata-doce (*Ipomoea batatas*) (VEASEY et al., 2007, 2008) e o inhame (*Dioscorea* spp.) (BRESSAN, 2005; BRESSAN et al., 2011, 2013; SIQUEIRA, 2011; SIQUEIRA et al., 2011, 2012, 2013; SILVA, L.R.G., 2012; SILVA, D.M., 2012; SILVA et al., 2013).

2.6 Utilização de marcadores morfológicos na análise de diversidade genética de espécies do gênero *Dioscorea*

A descrição e o registro de características morfológicas do material biológico, cuja expressão pode ou não ser influenciada pelo ambiente, favorece a utilização dos recursos genéticos em programas de melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Esta descrição aplica-se tanto a descritores referentes aos acessos de uma coleção de germoplasma como àqueles localizados no banco de genes (VALOIS et al., 1996).

Para a cultura do inhame, os descritores utilizados na caracterização morfológica, bem como na identificação de espécies, foram estabelecidos pelo *International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)* e *International Institute of Tropical Agriculture (IITA)* (IPGRI/IITA, 1997). Entretanto, este documento não reúne descritores morfológicos para a identificação de variedades da espécie *D. trifida*.

Com o intuito de caracterizar a diversidade das espécies de inhame, Onyilagha (1986) avaliou 14 acessos de *D. rotundata* utilizando caracteres morfológicos, os quais foram classificados em três grupos, tanto na análise de agrupamento como na análise de componentes principais (PCA). A análise de PCA mostrou que os caracteres com maior poder discriminatório foram: tamanho da folha, tamanho do tubérculo, tamanho de espiguetas florais por nó e comprimento da espiguetas. Rhodes e Martin (1972) utilizaram 100 caracteres para estudar a variação de 30 cultivares de *D. alata*, concluindo que apenas 28 foram úteis para a classificação das cultivares. Bressan (2005) avaliou a diversidade genética de 25 etnovariedades de *D. trifida* do Vale do Ribeira, São Paulo, por meio de 24 marcadores morfológicos. Pela análise de agrupamento houve a formação de três grupos, onde o resultado mostra a grande influência das unidades culturais sobre os caracteres morfológicos.

Bressan et al. (2011) avaliaram a diversidade genética de 16 variedades locais e 19 variedades comerciais de *D. alata* com base em marcadores morfológicos. Os resultados obtidos demonstraram uma menor diversidade genética das variedades comerciais, quando comparadas com as landraces, ressaltando a importância desses dados para a elaboração de estratégias de conservação *in situ/on farm* para esta cultura. O complexo de espécies *D. cayenensis/rotundata* também foi avaliado por Bressan et al. (2013) com base em caracteres morfológicos e as análises de agrupamento permitiram a separação das duas espécies.

O grande problema enfrentado na utilização da caracterização morfológica é a natureza quantitativa dos caracteres, que são fortemente influenciados pelo ambiente, pois depende da identificação e enumeração de características morfológicas visíveis que muitas vezes tornam-se subjetivas para o avaliador (BRESSAN, 2005). Ainda, o pequeno número de marcadores

morfológicos distintos em uma mesma linhagem e restrito às poucas espécies de plantas reduz a eficiência destes marcadores em estudos genéticos de plantas.

Dessa forma, as informações fornecidas pelos marcadores morfológicos em relação à diversidade genética de plantas devem ser complementadas por dados provenientes de marcadores moleculares, principalmente aqueles que utilizam como fonte de informação o DNA dos organismos em estudo.

2.7 Utilização de marcadores moleculares na análise de diversidade genética de espécies do gênero *Dioscorea*

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares distribuídos em todo o genoma do organismo, tornando-se uma importante ferramenta para a identificação de cultivares e caracterização de germoplasma, bem como o estudo de diversidade genética de plantas (KARP; EDWARDS, 1997). Atualmente, existe grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diversas finalidades em diferentes espécies vegetais, principalmente aquelas espécies cultivadas.

O melhor conhecimento da variabilidade genética de uma determinada espécie permite aperfeiçoar os programas de melhoramento de cultivares, principalmente no caso do inhame, planta poliplóide, dióica e de difícil sincronização das flores masculinas e femininas (MIGNOUNA et al., 2003). Neste contexto, os marcadores moleculares têm dado sua grande contribuição na compreensão da diversidade genética existente nas espécies do gênero *Dioscorea*. Assim, marcadores isoenzimáticos foram utilizados para estudos de diversidade genética de 269 cultivares de *D. alata* originários do sul do Pacífico, Ásia, África, Caribe e América do Sul (LEBOT et al., 1998) e no estudo da diversidade genética de diversos acessos do complexo *D. cayenensis/D. rotundata*, originários de diversos países da África (DANSI et al., 2000a; MIGNOUNA et al., 2003), bem como no entendimento de padrões de segregação para locos isoenzimáticos em *D. rotundata* (SCARCELLI et al., 2006). No Brasil, os marcadores isoenzimáticos foram utilizados para o estudo da diversidade genética entre etnovarietades do Vale do Ribeira das espécies *D. trifida*, *D. cayenensis*, *D. alata* e *D. bulbifera* (BRESSAN, 2005; BRESSAN et al., 2011, 2013), constatando-se alta variabilidade genética mantida pelos agricultores desta região, sendo tal variabilidade não estruturada no espaço.

Já os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foram utilizados para avaliar a variabilidade intra-específica em acessos de *D. bulbifera* originários da África, Ásia e Polinésia (RAMSER et al., 1996); para avaliar cultivares jamaicanas das espécies *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. trifida* e *D. esculenta* (ASEMOTA et al., 1995); e estudar o complexo *D. cayenensis/D. rotundata* em Guiné, República de Benin (DANSI et al., 2000b). Este marcador foi também utilizado, juntamente com marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) para a caracterização de germoplasma de *D. rotundata* (MIGNOUNA et al., 2003), e para a caracterização da variação entre espécies selvagens e cultivadas de *Dioscorea* (MIGNOUNA et al., 2005), tendo os autores concluído que as cultivares classificadas como *D. cayenensis* deveriam ser consideradas como um táxon separado de *D. rotundata*. O marcador AFLP tem sido também utilizado para avaliar a diversidade genética em *D. alata* e sua relação com outras nove espécies comestíveis de *Dioscorea* (MALAPA et al., 2005) e também em estudos sobre a domesticação do gênero *Dioscorea* (SCARCELLI et al., 2006).

Como diversas tecnologias de análises moleculares mais informativas estão constantemente sendo aprimoradas, outros marcadores, como SSR e ISSR, estão sendo utilizados para análise de diversidade genética do gênero *Dioscorea*.

2.7.1 Utilização de microssatélites (Simple Sequence Repeats-SSRs) na análise de diversidade genética de espécies do gênero *Dioscorea*

Sabe-se que os genomas dos eucariotos são densamente povoados por regiões de DNA composta de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem denominadas microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*) (TÓTH et al., 2000). Estes marcadores ocorrem em regiões próximas aos genes (MORGANTE et al., 2002; LI et al., 2004), e as sequências de DNA que os flanqueiam são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (CAIXETA et al., 2009).

Nos últimos anos, os microssatélites têm atraído a atenção de pesquisadores por diversas razões, incluindo seu uso na construção de mapas genéticos de diversos tipos de organismos (CREGAN et al., 1999). Embora inicialmente designados para pesquisas em humanos, a análise de microssatélites tem se tornado uma poderosa ferramenta para pesquisas em outros animais (SCHLÖTTERER et al., 1991) e plantas (ROA et al., 2000; COLLEVATTI et al., 2001). De acordo com Heywood e Iriondo (2003), os marcadores

microsatélites fornecem informações relevantes para identificar unidades de conservação e processos genéticos que ocorrem nas populações, tais como fluxo gênico e deriva genética.

Neste contexto, os marcadores baseados na amplificação de SSRs são bastante eficientes para elaboração de estratégias de conservação dos recursos genéticos. Estes marcadores são codominantes, multialélicos e altamente polimórficos, além de apresentar reprodutibilidade satisfatória, grande poder de resolução e baixo custo (SCHLÖTTERER, 2000; OLIVEIRA et al., 2006; CAIXETA et al., 2009). Por estes motivos os microsatélites são mais vantajosos para a realização de genotipagem e estudos das relações genéticas de cultivares, em relação a outras técnicas moleculares (HWANG et al., 2002; AGARWAL et al., 2008). Esta ferramenta tem sido utilizada no estudo de diversidade, estrutura genética e identificação genotípica de diversas culturas, entre elas: cevada (YAHIAOUI et al., 2007), trigo (STEPIÉN et al., 2007), arroz selvagem (KARASAWA et al., 2007), batata-doce (VEASEY et al., 2008), mandioca (SIQUEIRA et al., 2009, 2010) e inhame (HOCHU et al., 2006; SCARCELLI et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2012).

A fim de estudar a diversidade genética de *Dioscorea*, Tostain et al. (2006) desenvolveram *primers* de microsatélites para as espécies *D. alata*, *D. praehensilis* e *D. abyssinica*, onde foi avaliada também a transferibilidade destes *primers* para outras espécies, tais como: *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. bulbifera*, *D. nummularia* e *D. trifida*. Ainda, Hochu et al. (2006) desenvolveram marcadores microsatélites para a análise de 24 cultivares de *D. trifida*, que se mostraram bastante polimórficos entre elas. Outros estudos utilizando microsatélites merecem destaque. Dentre eles, o de Tostain et al. (2007), que avaliaram a diversidade genética de 146 acessos de *D. rotundata* Poir. em Benin, África Ocidental, com base em 10 sequências de SSRs plastidiais, marcadores nucleares e agromorfológicos. Uma média de 8,4 alelos por loco foi detectada. A heterozigotidade média foi de 0,57 e a média de conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foi de 0,51. Os resultados demonstraram que a estrutura da diversidade genética da espécie em Benin reflete as práticas de manejo da cultura pelos agricultores permitindo definir estratégias para a conservação da diversidade em inhame. Os *primers* desenvolvidos por Hochu et al. (2006), por sua vez, foram utilizados por Bousalem et al. (2006) para avaliar o padrão de herança de *D. trifida*, a partir da análise dos genótipos parentais e da progênie, onde foi relatado o comportamento tetraplóide para a espécie. Para estudar os padrões de evolução de inhame e estabelecer relações filogenéticas existentes entre espécies cultivadas e silvestres amostradas também em Benin, Chaïr et al. (2005) investigaram alterações nas sequências SSRs de cloroplastos em 148 acessos de inhame selecionados por cobrir uma maior diversidade genética do país.

No Brasil, Siqueira (2011) analisou a relação genética entre 73 variedades locais e 17 variedades comerciais de *D. alata* provenientes de diferentes regiões. Os resultados demonstraram uma mistura dos acessos, em grande parte devido à movimentação extensiva de fluxo humano. Siqueira et al. (2011) isolaram 14 marcadores microssatélites polimórficos utilizando a técnica de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites. Dez locos microssatélites foram selecionados para avaliar 80 acessos de *D. alata* de diferentes regiões do Brasil, dos quais nove apresentaram resultados satisfatórios. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou 0,39-0,78 e o poder de discriminação (PD) variou 0,15-0,91. Seis dos marcadores mostraram transferibilidade para a espécie *D. bulbifera*, *D. cayenensis*/*D. rotundata* e *D. trifida*. Siqueira et al. (2012) utilizaram nove locos de microssatélites para avaliar 36 acessos de *D. alata*. Os locos revelaram alto polimorfismo, com PIC variando de 0,57 a 0,77 e altos índices de diversidade genética de Shannon-Wiener (1,29, em média).

Silva, L.R.G. (2012) caracterizou a diversidade genética de 48 etnovarietades de *D. cayenensis*/*D. rotundata* coletadas em diferentes regiões do Brasil, e observou elevada e estruturada variabilidade genética dos acessos no espaço geográfico amostrado, considerando as duas espécies amostradas. Silva et al. (2013) isolaram e caracterizaram nove locos microssatélites para a espécie *D. cayenensis* e analisaram a transferibilidade para *D. rotundata*. Os valores do PIC em *D. cayenensis* variaram de 0,37-0,62, enquanto que em *D. rotundata* variaram de 0,15-0,66. O parâmetro D em *D. cayenensis* variou de 0,14-0,40, enquanto que em *D. rotundata* variou de 0,05-0,34. Verificou-se que os microssatélites representam uma ferramenta importante para caracterizar a diversidade genética de acessos de *D. cayenensis* e *D. rotundata*. Silva, D.M. (2012) caracterizou a diversidade genética de 42 acessos de *D. bulbifera* pertencente ao banco de germoplasma *ex situ* da ESALQ/USP. Para tanto, foram desenvolvidos seis primers de microssatélites específicos e polimórficos para a espécie, que juntamente com 10 primers heterólogos, foram utilizados para estudo de diversidade. Os resultados obtidos demonstraram que apesar dos acessos de *D. bulbifera* não estarem estruturados no espaço, estes apresentaram grande variabilidade genética.

2.7.2 Utilização de ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) na análise de diversidade genética de espécies do gênero *Dioscorea*

Uma das limitações da utilização dos marcadores microssatélites é a necessidade de conhecer as regiões que os flanqueiam para desenhar os *primers*. Portanto, alguns marcadores moleculares foram desenvolvidos, visando explorar as repetições microssatélites sem a necessidade de sequenciamento do DNA (CAIXETA et al., 2009). Entre esses marcadores

estão os marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), também conhecido como, AMP-PCR (Anchored microsatellite-primed PCR), onde repetições de di- ou trinucleotídeos marcadas com radioatividade e ancoradas com dois a quatro nucleotídeos em uma das extremidades são usadas como *primers* para PCR. Isso permite a amplificação de apenas parte das regiões amplificadas pelo marcador MP-PCR (Microsatellite-primed PCR), aumentando a reprodutibilidade, que é uma das limitações do uso do MP-PCR (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Os marcadores ISSR são dominantes e facilmente detectados usando poucos equipamentos, são bastante variáveis e fornecem grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador (WOLFE, 2005). São semiarbitrários, amplificados por PCR na presença de um *primer* complementar a um microssatélite alvo, multilocos e fornecem um padrão altamente polimórfico (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Cada banda corresponde a uma sequência delimitada de dois microssatélites invertidos (BORNET; BRANCHARD, 2001).

Os marcadores ISSRs são obtidos a partir de uma técnica simples, rápida e eficiente. Os produtos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pb de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade possivelmente devido ao uso de *primers* longos o que permite um subsequente uso de alta temperatura de anelamento (BORNET; BRANCHARD, 2001; REDY et al., 2002). Os marcadores ISSR têm sido utilizados para estimar a extensão da diversidade genética em nível inter e intraespecífico em uma ampla variedade de espécies. Devido à sua abundância e dispersão no genoma, tem sido muito empregado para estudar relações entre duas populações muito relacionadas (HUANG; SUN, 2000; DESHPANDE et al., 2001). Além disso, também tem sido utilizados em estudos de “fingerprinting”, seleção assistida por marcadores, filogenia e mapeamento genético (BORNET; BRANCHARD, 2001).

No gênero *Dioscorea* alguns estudos de diversidade genética têm sido realizados com base no marcador molecular ISSR. Dentre esses, Zhou et al. (2008) analisaram o nível de diversidade genética entre diferentes cultivares de *D. opposita* Thunb, muito utilizada na medicina tradicional chinesa. Os resultados obtidos sugeriram que essas cultivares de inhame chinês tem uma valiosa fonte de genes a ser explorado. Wu et al. (2009) avaliaram a relação e diversidade genética em *D. alata* e concluíram que a variação genética em *Dioscorea* ssp. é significativa, especialmente a diversidade em *D. alata*, cujo nível apresentou-se bastante elevado, fornecendo apoio da biologia molecular para distinção e melhoramento da espécie. Os dois estudos observaram que os marcadores ISSR proporcionaram uma avaliação satisfatória da diversidade genética de inhame e informações valiosas para ajudar na seleção de genitores em futuros programas de melhoramento de inhame.

Referências

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 617–631, 2008.
- ARNAU, G.; NEMORIN, A.; MALEDON, E.; ABRAHAM, K. Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L. (Dioscoreaceae) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 7, p. 1239-1249, 2009.
- ARRUDA, R. “Populações tradicionais” e a proteção dos recursos naturais em unidades de conservação. **Ambiente & Sociedade**, Campinas, n. 5, p. 79-92, 1999.
- ASEMOTA, H.N.; RAMSER, J.; LOPÉZ-PERALTA, C.; WEISING, K.; KAHL, G. Genetic variation and cultivar identification of Jamaican yam germplasm by random amplified polymorphic DNA analysis. **Euphytica**, Wageningen, v. 92, n. 3, p. 341-351, 1995.
- ASIEDU, R.; WANYERA, N.M.; NG, S.Y.C.; NG, N.Q. Yam. In: FUCCILIO, D.; SEARS, L.; STAPLETON, P. (Ed.). **Biodiversity in trust**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. chap. 6, p. 57-66.
- AYENSU, E.S.; COURSEY, D.G. Guinea yams: the botany, ethnobotany, use and possible future of yams in West Africa. **Economic Botany**, New York, v. 26, p. 301-318, 1972.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat ISSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 19, p. 209-215, 2001.
- BOUSALEM, M.; ARNAU, G.; HOCHU, I.; ARNOLIN, R.; VIADER, V.; SANTONI, S.; DAVID, J. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the *Dioscoreae*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, n. 3, p. 439-451, 2006.
- BOUSALEM, M.; VIADER, V.; MARIAC, C.; GOMEZ, R.; HOCHU, I.; SANTONI, S.; DAVID, J. Evidence of diploidy in the wild Ameridian yam, a putative progenitor of the endangered species *Dioscorea trifida* (Dioscoreaceae). **Genome**, Ottawa, v. 53, n. 5, p. 371-383, 2010.
- BRESSAN, E.A. **Diversidade isoenzimática e morfológica de inhame (*Dioscorea* spp.) coletados em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira – SP**. 2005. 172 p. Tese (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BRESSAN, E.A.; BRINER NETO, T.; ZUCCHI, M.I.; RABELLO, R.J.; VEASEY, E.A. Morphological variation and isozyme diversity in *Dioscorea alata* L. landraces from Vale do Ribeira, Brazil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, p. 494-502, 2011.
- BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A.; PERONI, N.; FELIPIM, A.P.; SANTOS, K.M.P. Collecting yam (*Dioscorea* spp.) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm in traditional agriculture small-holdings in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 144, p. 8-13, 2005.

BRINER NETO, T.; RABELLO, R.J.; VEASEY, E.A. Genetic structure and diversity in *Dioscorea cayenensis/D. rotundata* complex revealed by morphological and isozyme markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, 2013. No prelo.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 371-442.

CARMO, C.A.S. **Inhame e taro**: sistemas de produção familiar. Vitória: INCAPER, 2002. 289 p.

CEREDA, M.P. Importância das tuberosas tropicais. In: _____. **Agricultura**: tuberosa amiláceas latino americanas. São Paulo: Fundação Gargil, 2002. p. 13-25.

CHAÏR, H.; PERRIER, X.; AGBANGLA, C.; MARCHAND, J.L.; DAINOU, O.; NOYER, J.L. Use of cpSSRs for the characterization of yam phylogeny in Benin. **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 4, p. 674-684, 2005.

CHU, E.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Native and exotic species of *Dioscorea* used as food in Brazil. **Economic Botany**, New York, v. 45, n.4, p. 467-479, 1991.

CLEMENTE, C.; ROCHA, S.F.R.; COLE, D.M.; VIVAN, J.L. Conservação *on farm*. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2008. p. 511-543.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 349-356, 2001.

COURSEY, D.G. The origin and domestication of yams in Africa. In: HARLAN, J.R.; De WET, J.M.J.; STEMLER MOUTON, A.B.L. (Ed.). **Origin of African plant domestication**. Amsterdam: Mouton Hague, 1976. p. 383-408.

CURY, R. **Distribuição da diversidade genética e correlações de caracteres em etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) provenientes da agricultura tradicional do Brasil**. 2005. 163 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CREGAN, P.B.; MUDGE, J.; FICKUS, E.W.; MAREK, L.F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R.C.; MATTHEWS, B.F.; JARVIK, T.; YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 1525-1429, 1999.

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; ZOUNDJIHÉKPON, J.; SANGARE, A.; AHOUSOU, N.; ASIEDU, R. Identification of some Benin Republic's Guinea yam (*Dioscorea cayenensis/D. rotundata* complex) cultivars using Randomly Amplified Polymorphic DNA. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.47, n. 6, p.619-625, 2000a.

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; ZOUNDJIHÉKPON, J.; SANGARE, A.; ASIEDU, R.; AHOUSOU, N. Using isozyme polymorphism to assess genetic variation within cultivated

yams (*Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex) of the Republic of Benin. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 47, n. 4, p. 371-383, 2000b.

DENEVAN, W.M. **Cultivated landscapes of native Amazonian and the Andes**. New York: Oxford University Press, 2001. 396 p.

DESHPANDE, A.U.; APTE, G.P.; BAHULIKAR, R.A.; LAGU, M.D.; KULKAMI, B.G.; SURESH, H.S.; SINGH, N.P.; RAO, M.K.; GUPTA, V.S.; PANT, A.; DIEGUES, A.C.S.; ARRUDA, R.S. **Saberes tradicionais e biodiversidade no Brasil**. Brasil: Ministério do Meio Ambiente, 2001. 176 p.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C.E. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 401-475.

DIEGUES, A.C.; ARRUDA, R.S.V. **Saberes tradicionais e biodiversidade no Brasil**. São Paulo: USP, NUPAUB/USP, 2001. 176 p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. **Cultivo da batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)**. Brasília, 1999. 8 p.

FAOSTAT database for 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/crop/statistics/en>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

FARALDO, M.I.F.; SILVA, R.M.; MARTINS, P.S. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 499-505, 2000.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, CERNAGEM, 1996. 220 p.

GOVAERTS, R.; WILKIN, P.; SAUNDERS, R.M.K. **World checklist of Dioscoreales, yam and their allies**. Kew: Kew Publishing Royal Botanic Gardens, 2007. 65 p.

GREUTER, W.; BARRIE, F.R.; BURDET, H.M.; HAWKSWORTH, D.L.; JORGENSEN, P.M.; NICOLSON, D.H.; SILVA, P.C.; TREHANE, P. **International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo code)**. Berlin: Koeltz Scientific Books. 1994. 91 p.

HEYWOOD, V.H.; IRIONDO, J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, Boston, v. 113, p. 321-335, 2003.

HOCHU, I.; SANTONI, S.; BOUSALEM, M. Isolation, characterization and cross-species amplification of microsatellite DNA loci in the tropical American yam *Dioscorea trifida*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 137-140, 2006.

HUANG, J.C.; SUN, M. Genetic diversity and relationships of sweet-potato and its wild relatives in *Ipomoea series batatas* (Convolvulaceae) as revealed by ISSR and restriction analysis of chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1050-1060, 2000.

HWANG, S.Y.; TSENG, Y.T.; LO, H.F. Application of simple sequence repeats in determining the genetics relationships of cultivars used in sweet potato polycross breeding in Taiwan. **Scientia Horticulturae**, v. 93, p. 215-224, 2002.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE/INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE. **Descritores para el ñame (*Dioscorea* spp.)**. Roma, 1997. 61 p.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Conservación ex situ de recursos fitogenéticos**. Roma: IPGRI, 2000. 209 p.

JARVIS, D.I.; MYER, L.; KLEMICK, H.; GUARINO, L.; SMALE, M.; BROWN, A.H.D.; SADIKI, M.; STHAPIT, B.; HODGKIN, T. **A training guide for *In Situ* conservation on-farm**. Rome: IPGRI, 2000. 161 p.

KARASAWA, M.M.G.; VENCovsky, R.; SILVA, C.M.; ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X.; VEASEY, E.A. Genetic structure of Brazilian *Oryza glumaepatula* Steud. (Poaceae) populations studied with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 400-410, 2007.

KARP, A.; EDWARDS, K. DNA markers: a global overview. In: CAETANO-ANNOLES, G.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **DNA markers: protocols, applications and overviews**. New York: Wiley-VCH, 1997. p. 1-14.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids**. London: CABI, 2009. 413 p.

LI, Y.C.; LOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 991-1007, 2004.

MALAPA, R.; ARNAU, G.; NOYER, J.L.; LEBOT, V. Genetic diversity of the greater yam (*Dioscorea alata* L.) and relatedness to *D. nummularia* Lam. And *D. transversa* Br. as revealed with AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 52, p. 919-929, 2005.

MARTIN, F.W.; DEGRAS, L. Tropical yams and their potential: minor cultivated *Dioscorea* species. **Scientific Reports of the Faculty of Agriculture**, Okayama, v. 72, p. 19-26, 1978.

MESQUITA, A.S. Inhame e taro: cenário dos mercados internacional, brasileiro e baiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 54-64, 2002.

MIGNOUNA, H.D.; ABANG, M.M.; FAGBEMI, S.A. A comparative assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for white yam (*Dioscorea rotundata*) germplasm characterization. **Annals of Applied Biology**, London, v. 142, p. 269-276, 2003.

MIGNOUNA, H.D.; ABANG, M.M.; WANYERA, N.W.; CHIKALEKE, V.A.; ASIEDU, R.; THOTTAPPILLY, G. PCR marker-based analysis of wild and cultivated yams (*Dioscorea* spp.) in Nigeria: genetic relationships and implications for *ex situ* conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 52, p. 755-763, 2005.

MONTALDO, A. **Cultivo de raíces y tubérculos tropicales**. Lima: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, 1991.

MONTEIRO, D.A. Situação atual e perspectiva do inhame no estado de São Paulo. In: CARMO, C.A.S. **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória: INCAPER, 2002. p. 84-92.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWEL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genome. **Nature Genetic**, London, v. 30, p. 194-200, 2002.

MÜHLEN, G.S.; MARTINS, P.S.; ANDO A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 319-328, 2000.

MURAYAMA, S. **Horticultura**. 2. ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1999. 128 p.

ODU, B.O.; ASIEDU, R.; HUGHES, J.d'A.; SHOYINKA, S.A.; OLADIRAN, O.A. Identification of resistance to Yam mosaic virus (YMV), genus Potyvirus in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir). **Field Crop Research**, Amsterdam, v. 89, p. 97-195, 2004.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

ONYILAGHA, J.C. Numerical analysis of variation among Nigerian *Dioscorea rotundata* accessions. **Euphytica**, Wageningen, v. 35, n. 32, p. 413-419, 1986.

PEDRALLI, G. Collecting yam germplasm in Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 22, p. 83-84, 1990

_____. **Revisão taxonômica das espécies de *Dioscoreaceae* (R.Br.) Lindley da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil**. 1998. 400 p. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

_____, G. Distribuição geográfica e taxonomia das famílias Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. In: CARMO, C.A.S. (Ed.). **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória: INCAPER, 2002. p. 15-26.

PERONI, N.; HANAZAKI, N. Current and lost diversity of cultivated varieties, especially cassava, under swidden cultivation systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 171-183, 2002.

PERONI, N.; MARTINS, P.S. Influência da dinâmica agrícola itinerante na geração de diversidade de etnovariedades cultivadas vegetativamente. **Interciencia**, Venezuela, v. 25, n. 1, p. 22-29, 2000.

PERONI, N.; KAGEYAMA, P.Y.; BEGOSSI, A. Molecular differentiation, diversity, and folk classification of “sweet” and “bitter” cassava (*Manihot esculenta*) in Caiçara and

Caboclo management systems (Brazil). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, p. 1333-1349, 2007.

PERONI, N.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. Diversidade inter e intra-específica e uso de análise multivariada para morfologia de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): um estudo de caso. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 3, p. 587-595, 1999.

RAMOS-ESCUADERO, F.; SANTOS-BUELGA, C.; PÉREZ-ALONSO, J.J.; YÁÑES, J.A.; DUEÑAS, M. HPLC-DAD-ESI/MS identification of anthocyanins in *Dioscorea trifida* L. yam tuber (purple sachapapa). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, p. 745-752, 2010.

RAMSER, J.; LÓPEZ-PERALTA, C.; WETZEL, R.; WEISING, K.; KAHL, G. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 17-25, 1996.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; REDDY, E.A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, p. 9-17, 2002.

RHODES, A.M.; MARTIN, F.W. Multivariety studies of variation in yam (*Dioscorea alata* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 97, p. 685-688, 1972.

ROA, A.C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M.C.; MAYA, M.M.; BONIERBALE, M.W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. Cross species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 87, p. 1647-1655, 2000.

SANTOS, E.S.; MACEDO, L.S. Tendências e potencialidades da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2, 2002, João Pessoa. **Anais....** João Pessoa: EMEPA/PB, 2002. p. 1-5.

SANTOS, E.S.; CEREDA M.P.; PEDRALLI, G.; PUIATTI, M. Denominações populares das espécies de *Dioscorea* e *Colocasia* no Brasil. **Tecnologia e Ciência**, João Pessoa, v. 1, p. 37-41, 2007.

SANTOS, E.S.; CAZÉ FILHO, J.; LACERDA, J.T.; CARVALHO, R.A.; FONTINÉLLI, I.S.C.; SILVA, J.B.; BARBOSA, M.M.; CASIMIRO, C.M. **Inhame e preservação ambiental**. João Pessoa: EMBRAPA; EMEPA, 2006. 6 p.

SCARCELLI, N.; TOSTAIN, S.; MARIAC, C.; AGBANGLA, C.; DA, O.; BERTHAUD, J.; PHAM, J.L. Genetic nature of yams (*Dioscorea* sp.) domesticated by farmers in Benin (West Africa). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, p. 121-130, 2006.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, Heidelberg, v. 109, p. 365-371, 2000.

SCHLÖTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, London, v. 354, p. 63-65, 1991.

SECRETARIA DE AGRICULTURA. **Cultura do cará**. 2002. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/cara.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2010.

SILVA, D.M. **Diversidade genética de cará-do-ar (*Dioscorea bulbifera* L.) originários de roças de agricultura tradicional por meio de marcadores microssatélites**. 2012. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SILVA, L.R.G. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização genética de etnovarietades de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis* – *D. rotundata***. 2012. 79 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SILVA, L.R.G.; BAJAY, M.M.; MONTEIRO, M.; MEZETTE, T.F.; PINHEIRO, J.B.; VEASEY, E.A. Isolation and characterization of microsatellites for an important tuber crop (*Dioscorea cayenensis*) and cross-amplification in *D. rotundata* (Dioscoreaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, 2013. No prelo.

SIQUEIRA, M.V.B.M. Yam: aneglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 6-20, 2011.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; DEQUIGIOVANNI, G.; CORAZON-GUIVIN, M.; FELTRAN, J.C.; VEASEY, E.A. DNA fingerprinting of water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in Brazil based on microsatellite markers. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 653-659, 2012.

MARCONI, T.G.; BONATELLI, M.L.; VEASEY, E.A. New microsatellite loci for water yam (*Dioscorea alata*, Dioscoreaceae) and crossamplification for other *Dioscorea* species. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 98, p. 144-146, 2011.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; PINHEIRO, T.T.; BORGES, A.; VALLE, T.L.; ZATARIM, M.; VEASEY, E.A. Microsatellite polymorphisms in cassava landraces from the Cerrado biome, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Biochemical Genetics**, New York, v. 48, n. 9-10, p. 879-895, 2010.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; SILVA, L.R.G.; FERREIRA, A.B.; MING, L.C.; VEASEY, E.A. Distribution, management and diversity of yam local varieties in Brazil: a study on *Dioscorea alata* L. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, 2013. No prelo.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; BORGES, A.; PEREIRA, K.J.C.; PINTO, J.G.; VEASEY, E.A. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 104-110, 2009.

STEPHENS, J.M. **Cushcush – *Dioscorea trifida* L.** Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/mv057>>. Acesso em: 27 dez. 2009.

STEPIÉN, L.; MOHLER, V.; BOCIANOWSKI, J.; KOCZYK, G. Assessing genetic diversity of olish wheat (*Triticum aestivum*) varieties using microsatellite markers. **Genetic Resource Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, p. 1499–1506, 2007.

TAMIRU, M.; BECKER, H.C.; MAASS, B.L. Genetic in yam germplasm from Ethiopia and their relatedness to the main cultivated *Dioscorea* species assessed by AFLP markers. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 1743-1753, 2007.

TOSTAIN, S.; SCARCELLI, N.; BROTTIER, P.; MARCHAND, J.L.; PHAM, J.L.; NOYER, J.L. Development of DNA microsatellite markers in tropical yam (*Dioscorea* sp.). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 173-175, 2006.

TOSTAIN, S.; AGBANGLA, C.; SCARCELLI, N.; MARIAC, C.; DAÏNOU, O.; BERTHAUD, J.; PHAM, J. Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 71-81, 2007.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, New York, v. 10, p. 967-981, 2000.

UTERMOEHL, B.; GONÇALVES, P. Conservação na roça (*in situ*) da agrobiodiversidade Guarani. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 1, p. 1708-1711, 2007.

VALOIS, A.C.C.; SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 62 p. (Documentos, 22).

VEASEY, E.A.; BORGES, A.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Phenology and morphological diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) landraces of the Vale do Ribeira. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 416-427, 2007.

VEASEY, E.A.; BORGES, A.; ROSA, M.S.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Genetic diversity in Brazilian sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) landraces assessed with microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 3, p. 725-733, 2008.

VEASEY, E.A.; SIQUEIRA, M.V.B. M.; SILVA, L.R.G.; NASCIMENTO, W.F.; FERREIRA, A.B.; SILVA, D.; SILVA, E.; MING, L.C.; PERONI, N.; SANTOS, A.H. Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas brasileiros. In: KFFURI, C.W.; AMOROZO, M.C.M.; MING, L.C. (Org.). **Agrobiodiversidade no Brasil: experiências e caminhos da pesquisa**. Recife: NUPEEA, 2010. p. 45-74.

VIANA, V.M.; PINHEIRO, L.A.F.V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 25-42, 1998.

WOLFE, A.D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzimology**, Welwyn, v. 395, p. 134-144, 2005.

WU, Z.; LENG, C.; TAO, Z.; WEI, Y.; JIANG, C. Genetic diversity of *Dioscorea alata* on ISSR analysis. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, Pei-Ching, v. 34, n. 23, p. 3017-3020, 2009.

YAHIAOUI, S.; IGARTUA, E.; MORALEJO, M.; RAMSAY, L.; MOLINA-CANO, J.L.; CIUDAD, F.J.; LASA, J.M.; GRACIA, M.P.; CASAS, A.M. Patterns of genetic and eco-

geographical diversity in Spanish barleys. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 116, p. 271-282, 2007.

ZARATE, N.A. H.; VIEIRA, M.C.; SIQUEIRA, J. G. Produção de quatro clones de cará em Dourados/MS. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 56-60, 1996.

ZHOU, Y.; ZHOU, C.; YAO, H.; LIU, Y.; TU, R. Amplification of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb) cultivars. **Life Science Journal**, Xinxiang, v. 5, n. 4, p. 6-12, 2008.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (ssr)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar 53 acessos da espécie *D. trifida* L. provenientes dos Estados de Santa Catarina, São Paulo, Mato Grosso e Amazonas, utilizando marcadores morfológicos, SSR (Simple Sequence Repeats) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), com o intuito de verificar o nível de diversidade genética que está sendo mantido pelos agricultores dessas regiões do Brasil.

3.2 Específicos

- Obter informações a respeito da distribuição, procedência, manejo e uso das variedades de *D. trifida* mantidas pelos agricultores situados nos Estados de Santa Catarina, São Paulo, Mato Grosso e Amazonas, Brasil.
- Caracterizar a diversidade genética de *D. trifida* com base em marcadores morfológicos;
- Caracterizar a diversidade genética de *D. trifida* com base em dois marcadores moleculares, SSR e ISSR;
- Realizar análise comparativa quanto à estruturação da diversidade genética de acessos de *D. trifida* entre e dentro dos locais de coleta (Santa Catarina, São Paulo, Mato Grosso e Amazonas).
- Estimar a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas baseadas em dados de SSR, ISSR e coordenadas geográficas, bem como entre as distâncias genéticas de ambos os marcadores moleculares;

4 HIPÓTESES

- Existe variabilidade genética para marcadores morfológicos, SSR e ISSR entre acessos de *D. trifida* considerando as diferentes localidades amostradas;
- A variabilidade genética para marcadores morfológicos, SSR e ISSR em acessos de *D. trifida* está estruturada no espaço e a maior parte desta variabilidade concentra-se dentro das diferentes localidades amostradas. Portanto, espera-se encontrar correlação positiva entre distâncias genéticas e geográficas, uma vez que estudos preliminares com os marcadores SSR nesta espécie mostraram evidências nesse sentido;
- Não existe correlação entre as distâncias genéticas baseadas em dados de SSR e ISSR. Esta hipótese está baseada em estudos prévios com outras espécies.

5 DISTRIBUIÇÃO, MANEJO E DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DA ESPÉCIE AMEAÇADA DE INHAME AMERÍNDIO (*Dioscorea trifida* L.)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de *Dioscorea trifida* no Brasil e obter informações a respeito da sua distribuição, manejo e diversidade. Para tanto, foram visitados e entrevistados agricultores de 21 comunidades, nos Estados de São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso. Durante as visitas, foram coletados 51 acessos, os quais juntamente com dois acessos adquiridos em feiras no Estado do Amazonas, foram caracterizados por meio de 16 descritores morfológicos. A maioria dos entrevistados era homem (75%) com média de idade de 59,5 anos. Observou-se um número reduzido de jovens e mão de obra disponível para as atividades agrícolas, cerca de três indivíduos por roça. A maior parte dos agricultores (56%) cultivava apenas uma variedade de *D. trifida*, embora 44% tenham declarado o cultivo de mais de uma variedade, procedimento que visa dar maior garantia de colheita. Vários nomes populares foram observados para *D. trifida*, sendo *cará roxo*, a denominação mais utilizada pelos agricultores (43,4%). Os caracteres referentes às túberas, como cor da casca e da polpa, foram os mais relevantes para a distinção dos acessos. Os resultados obtidos poderão colaborar para elaborar estratégias de conservação, tanto *ex situ* como *in situ*, dentro da visão de conservação *on farm*.

Palavras-chave: Agricultura tradicional; Conservação *in situ/on farm*; Túberas; Variabilidade genética

Abstract

The objective of this study was to verify the occurrence of *Dioscorea trifida* in Brazil and to obtain information about the distribution, management and diversity within this species. For this, the farmers from 21 communities in the States of São Paulo, Santa Catarina and Mato Grosso were interviewed. During the visits, 51 accessions were collected, and together with two accessions obtained at local markets of Amazonas, were characterized using 16 morphological traits. Most the interviewed farmers were men (75%) with a mean age of 59.5 years. Just a few young people and labor force were available for agricultural activities, with an average of only three individuals per farm. Most farmers (56%) grew only one variety of *D. trifida*, although 44% plant more than one variety, which aims to give greater assurance at harvest. Many popular names were observed for *D. trifida*, and *cará roxo* (purple yam) was the name most used by farmers (43.4%). Characters referring to the tuber, such as skin and flesh color, were most relevant for the distinction of the accessions. The results of this study may collaborate to develop strategies for conservation, both *ex situ* and *in situ*, within the view of *on farm* conservation.

Keywords: Traditional agriculture; *In situ/on farm* conservation; Tuber; Genetic variation

5.1 Introdução

O gênero *Dioscorea* é o maior e o mais importante da família Dioscoreaceae, apresentando cerca de 644 espécies (GOVAERTS et al., 2007). Entre estas apenas dez são consideradas importantes na alimentação humana (LEBOT, 2009), sendo que no Brasil

apenas *D. alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. rotundata* Poir., *D. bulbifera* L. e *D. trifida* L. são cultivadas e consumidas (PEDRALLI, 1988).

Domesticada pelos povos pré-colombianos e com distribuição neotropical, *D. trifida* foi provavelmente a primeira espécie de inhame cultivada pelos povos indígenas e imigrantes europeus e africanos na Amazônia (LEBOT, 2009; BOUSALÉM et al., 2010). Apesar de ainda existir controvérsias quanto à origem e domesticação desta espécie e sua história evolutiva ser pouco documentada, estudos demonstram que dentre as espécies de inhame importantes economicamente no Brasil, *D. trifida* se originou na América do Sul, mais precisamente em áreas localizadas na fronteira entre Brasil, Suriname, Guiana e Guiana Francesa (PEDRALLI, 1992).

No Brasil, *D. trifida* ocorre em áreas de florestas pluviais, cerrados do planalto Central, campos rupestres da Serra do Espinhaço e florestas estacionais adjacentes a estes campos (PEDRALLI, 2002), sendo mantida e propagada por agricultores tradicionais do Vale do Ribeira, São Paulo (BREISSAN et al., 2005), Baixada Cuiabana, Mato Grosso (FERREIRA et al., 2010), Manaus e redondezas, calha do Rio Negro e Belém, de acordo com Ming¹ (informação verbal). Apesar do funcionamento precário das atividades inerentes à produção agrícola e à falta de diversificação no consumo, a cultura consiste numa importante fonte de alimento, pois seus tubérculos possuem alta qualidade nutritiva, além de propriedades antimicrobiana, diurética e energizante, o que permite seu uso no combate a desnutrição e tratamento de doenças como diabetes e redução de colesterol (RAMOS-ESCUDEIRO et al., 2010).

Embora os tubérculos apresentem alta qualidade nutritiva e sejam bastante apreciados na culinária de diversas comunidades brasileiras, pouco tem sido observado sobre o cultivo de *D. trifida* em nível comercial, sendo a cultura subutilizada e o cultivo realizado por agricultores tradicionais para sua própria subsistência (CARMO, 2002). Entretanto, em alguns Estados brasileiros, tais como no Amazonas e Santa Catarina, a comercialização dessa espécie ocorre de maneira intensa (VEASEY et al., 2010).

Ao longo das últimas décadas, agricultores tradicionais têm sofrido fortes pressões socioeconômicas que vem ocasionando diminuição das atividades agrícolas, abandono das roças, e consequentemente perda de diversidade genética das espécies de inhame, bem como de outras culturas, como mandioca e batata-doce (SIQUEIRA; VEASEY, 2009; SIQUEIRA, 2011). Neste contexto, observa-se a necessidade de estudos para verificar os danos causados

¹ MING, L.C. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu.

por essas pressões à cultura do inhame, estimar a diversidade genética manuseada por estes agricultores e elaborar estratégias de conservação e manutenção dessas variedades, que constituem importante fonte de genes responsáveis por diversas características de interesse agrônomo, tais como resistência a pragas, patógenos e fatores abióticos.

Estudos relacionados à caracterização morfológica de acessos de *D. trifida* são escassos, tais como os estudos conduzidos por Bressan (2005), que avaliou 25 variedades locais de *D. trifida* coletados no Vale do Ribeira, São Paulo. Entretanto, informações sobre a morfologia da espécie são importantes para auxiliar na sua manutenção e conservação. Com base em caracteres morfológicos, Melo Filho et al. (2000) classificaram 11 acessos mantidos na Coleção de germoplasma de inhame da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brasil, enquanto Mignouma et al. (2002) caracterizaram 45 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata* coletados em Camarão, África e Hasan et al. (2008) avaliaram a variação morfológica entre 70 acessos de *D. alata* da Malásia; Bressan et al. (2011) avaliaram a diversidade genética de 16 *landraces* de *D. alata* coletadas no Vale do Ribeira, São Paulo; Bressan et al. (2013) estudaram a estrutura e a diversidade genética de acessos do complexo *D. cayenensis/D. rotundata*, também coletados no Vale do Ribeira, com base em marcadores morfológicos e isoenzimáticos, e Silva, L.R.G. (2012) realizou a caracterização morfológica de 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata* provenientes de diversas regiões brasileiras.

Este estudo teve como objetivo obter informações referentes à distribuição, ao manejo e à diversidade morfológica de variedades locais de *D. trifida* mantidas por pequenos agricultores no Brasil com o intuito de auxiliar na elaboração de estratégias de conservação mais eficaz para a espécie.

5.2 Material e Métodos

Foram visitadas 21 comunidades de nove municípios brasileiros, distribuídas nos Estados do Amazonas, Santa Catarina, São Paulo e Mato Grosso, localizadas entre as latitudes 14°43'S e 26°15'S e longitudes 44°05'O e 57°59'O (Figura 2).

Durante as visitas foram obtidas informações referentes à caracterização socioeconômica dos agricultores, ao manejo e uso das variedades de *D. trifida* por meio de entrevistas e questionários semi-estruturados previamente padronizados (Anexo). Simultaneamente, com o consentimento dos proprietários, foi realizada a coleta de túberas de inhame nas propriedades, de forma que todas as variedades cultivadas e consumidas nesses locais pudessem ser amostradas e mantidas *ex-situ*.

Os materiais coletados (Tabela 1) foram trazidos para o Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP. As túberas foram plantadas em vasos em casa de vegetação, a fim de permitir uma primeira etapa de brotação e quarentena das plantas. Dois meses após o plantio, as mudas foram transplantadas para o campo experimental com duas repetições (Figura 3). O espaçamento entre fileiras e entre plantas foi de 2,5m e 1,5m, respectivamente.

Foram utilizados 16 descritores morfológicos para caracterizar os acessos, sendo 11 caracteres qualitativos e cinco quantitativos (Tabela 2). Esses descritores foram selecionados a partir de uma lista desenvolvida pelo *International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)* e *International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, localizado em Ibadán, Nigéria, que reúne descritores morfológicos para várias espécies do gênero *Dioscorea*, exceto *D. trifida* (IPGRI/IITA, 1997). A caracterização foi realizada em duas plantas representantes de cada acesso, sendo que os caracteres quantitativos foram obtidos a partir da média de dez medidas tomadas ao acaso.

As informações referentes à caracterização morfológica e socioeconômica, bem como aquelas relacionadas ao manejo e consumo da espécie *D. trifida* foram avaliadas por análises descritivas e posteriormente comparadas entre os diferentes locais de estudo.

Figura 2 - Locais de coleta de *Dioscorea trifida* L. no Brasil. Os números dos acessos estão identificados na Tabela 1

Figura 3 - Desenvolvimento das plantas de *Dioscorea trifida* L. em casa de vegetação (A) e vista parcial do experimento após transplântio dos acessos (B) para o banco de germoplasma de inhame do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP

Tabela 1 - Acessos avaliados neste estudo de *Dioscorea trifida* L., coletados no Brasil

(continua)											
Nº	ID	Município	Comunidade	Nome popular	Latitude (S)	Longitude (O)	Cor do caule ¹	Nº de lóbulos	Nº de túberas	CC das túberas	CP das túberas
01	180	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará roxo</i>	23°15'	44°01'	Verderoxa	5	18	Marrom	Roxabr
02	181	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará branco</i>	23° 17'	44°05'	Verdemar	5	6	Marrom	Roxabr
03	182	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará roxo</i>	23°18'	44°52'	Verdemar	5	5	Marrom	Roxabr
04	183	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará roxo</i>	23°17'	44°51'	Verde roxa	5	12	Marrom	Roxabr
05	184	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará roxo</i>	23°18'	44°51'	Verde roxa	5	2	Marrom	Roxabr
06	185	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará roxo</i>	23°18'	44°51'	Verde roxa	5	3	Marrom	Roxabr
07	187	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará branco</i>	23°18'	44°51'	Verdemar	5	8	Marrom	Branca
08	191	Ubatuba-SP	Sertão das Cutias	<i>Cará roxo</i>	23°22'	44°58'	Verde roxa	5	18	Marrom	Roxa
09	193	Ubatuba-SP	Rio Escuro	<i>Cará branco</i>	23°28'	45°08'	Verdemar	5	7	Marrom	Branca
10	195	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	<i>Cará cobrinha</i>	23°31'	45°13'	Verdemar	5	6	Marrom	Branca
11	196	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	<i>Cará branco</i>	23°31'	45°13'	Verde roxa	5	13	Amarela	Branca
12	197	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará roxo</i>	23°17'	44°51'	Verde roxa	5	2	Marrom	Roxabr
13	198	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	<i>Cará roxo</i>	23°31'	45°13'	Verde roxa	5	16	Marrom	Roxabr
14	201	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	<i>Cará roxo</i>	23°31'	45°14'	Verdemar	5	8	Marrom	Roxabr
15	203	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	<i>Cará roxo</i>	23°31'	45°14'	Verde roxa	5	11	Marrom	Roxabr
16	204	Ubatuba-SP	Rio Escuro	<i>Cará roxo</i>	23°28'	45°08'	Verde roxa	5	25	Marrom	Roxabr
17	208	Ubatuba-SP	Araribá	<i>Cará roxo</i>	23°32'	45°15'	Verde roxa	5	20	Amarela	Roxabr
18	210	Ubatuba-SP	Sertão de Ubatumirim	<i>Cará roxo</i>	23°29'	45°10'	Verde roxa	5	3	Marrom	Branca
19	216	Ubatuba-SP	Fazenda da Caixa	<i>Cará roxo</i>	23°31'	45°14'	Verde roxa	5	6	Marrom	Roxa
20	217	Ubatuba-SP	Feira de Ubatuba	<i>Cará roxo</i>	23°27'	45°09'	Verde roxa	5	9	Amarela	Roxabr
21	236	Manaus-AM	Feira em Manaus	<i>Cara roxo</i>	03°08'	60°01'	Verde roxa	5	13	Marrom	Roxa
22	237	Barcelos-AM	Feira em Barcelos	<i>Cará</i>	0°58'	62°55'	Verde roxa	5	12	Amarela	Roxa
23	281	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Cará</i>	26°10'	48°55'	Verde roxa	5	9	Marrom	Branca
24	282	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Cará mimoso</i>	26°09'	48°56'	Verde roxa	5	8	Amarela	Branca
25	283	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Cará</i>	26°09'	48°58'	Verde roxa	5	11	Marrom	Branca
26	285	S. F. do Sul-SC	Acaraí	<i>Cará pão</i>	26°11'	48°53'	Verde roxa	5	5	Marrom	Branca

Tabela 1 - Acessos avaliados neste estudo de *Dioscorea trifida* L., coletados no Brasil

Nº	ID	Município	Comunidade	Nome popular	Latitude (S)	Longitude (O)	Cor do caule ¹	Nº de lóbulos	Nº de túberas	(conclusão)	
										CC das túberas	CP das túberas
27	286	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Cará mimoso</i>	26°15'	48°37'	Verderoxa	5	9	Amarela	Branca
28	287	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Carcanhá de nego</i>	26°09'	48°59'	Verderoxa	5	11	Marrom	Branca
29	290	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Cará mimoso</i>	26°09'	48°59'	Verderoxa	5	8	Amarela	Branca
30	292	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Cará</i>	26°09'	48°59'	Verderoxa	5	1	Amarela	Branca
31	297	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Cará</i>	26°09'	48°59'	Verderoxa	5	7	Amarela	Branca
32	298	Joinville-SC	Rio da Prata	<i>Cará</i>	26°11'	48°58'	Verderoxa	5	10	Marrom	Branca
33	301	Joinville-SC	Rio da Prata	<i>Cará mimoso</i>	26°11'	48°58'	Verderoxa	5	7	Amarela	Branca
34	302	Joinville-SC	Pirabeiraba	<i>Cará</i>	26°10'	48°57'	Verderoxa	5	11	Amarela	Branca
35	312	Iguape-SP	Pontalzinho – Icapara	<i>Cará S João branco</i>	24°40'	47°27'	Verderoxa	5	1	Amarela	Roxabr
36	313	Iguape-SP	Cavalcanti	<i>Cará-pipa</i>	24°43'	47°45'	Verderoxa	5	10	Marrom	Roxa
37	323	Iguape-SP	Pontalzinho – Icapara	<i>Cará S João roxo</i>	24°40'	47°27'	Verderoxa	5	4	Marrom	Roxabr
38	328	Iguape-SP	Momuna	<i>Cará São João roxo</i>	24°42'	47°40'	Verderoxa	5	2	Marrom	Branca
39	329	Iguape-SP	Momuna	<i>Cará S João branco</i>	24°42'	48°40'	Verderoxa	5	8	Amarela	Branca
40	335	Acorizal-MT	Carumbé	<i>Cará roxo</i>	15°08'	56°12'	Verderoxa	3	1	Amarela	Roxa
41	336	Acorizal-MT	Carumbé	<i>Cará roxo</i>	15°08'	56°12'	Verderoxa	3	4	Amarela	Roxa
42	340	Cuiabá-MT	Rio dos Couros	<i>Cará pé de anta</i>	15°36'	55°48'	Verderoxa	5	3	Marrom	Roxa
43	343	Acorizal, MT	Carumbé	<i>Cará branco</i>	15°08'	56°12'	Verderoxa	5	9	Amarela	Branca
44	344	Nobres-MT	Sela Dourada	<i>Cará do Joaquim</i>	15°36'	56°48'	Verderoxa	5	9	Amarela	Branca
45	345	Jangada-MT	Sto. Antônio do Barreiro	<i>Cará roxo</i>	15°08'	56°17'	Verderoxa	5	7	Marrom	Roxabr
46	350	Nobres-MT	Sela Dourada	<i>Cará branco</i>	15°34'	56°46'	Verderoxa	5	7	Marrom	Roxabr
47	351	Nobres-MT	Sela Dourada	<i>Cará mão de anta</i>	15°30'	56°42'	Verderoxa	5	13	Marrom	Branca
48	352	Rosário Oeste-MT	Timbozal	<i>Cará mão de anta</i>	14°51'	56°23'	Verdemar	5	3	Marrom	Roxa
49	355	Acorizal-MT	Chapada Vacaria	<i>Cará roxo</i>	15°03'	56°08'	Verde roxa	5	3	Marrom	Roxa
50	361	Nobres-MT	Sela Dourada	<i>Cará roxo</i>	14°43'	56°15'	Verdemar	5	2	Marrom	Roxa
51	364	Rosário Oeste-MT	Barranco Alto	<i>Pombinho branco</i>	15°14'	57°59'	Verde roxa	5	10	Marrom	Roxa
52	366	Nobres-MT	Sela Dourada	<i>Cará roxo cumprido</i>	14°43'	56°15'	Verde roxa	5	3	Marrom	Roxa
53	368	Rosário Oeste-MT	Barranco Alto	<i>Cará roxo</i>	15°17'	57°50'	Verde roxa	5	15	Marrom	Roxabr

* Verde e marrom(Verde mar), Verde e roxa (Verde roxa); Roxa e branca (Roxabr); Cor da casca (CC); Cor da polpa (CP)

Tabela 2 - Descritores morfológicos utilizados para caracterização dos acessos avaliados de *Dioscorea trifida* L

Descritores	
1. Cor do caule	9. Número de lóbulos
2. Ausência/presença de asas no caule	10. Largura da folha
3. Ausência/presença de espinhos no caule	11. Comprimento do pecíolo
4. Direção de crescimento	12. Cor do pecíolo
5. Diâmetro do caule	13. Ausência/presença de túberas subterrâneas
6. Forma do caule	14. Número de túberas
7. Posição das folhas	15. Cor da casca das túberas
8. Forma das folhas	16. Cor da polpa das túberas

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Distribuição e aspectos socioeconômicos

Foram coletados um total de 53 acessos de *D. trifida*, sendo 25 acessos provenientes do Estado de São Paulo, 14 acessos do Mato Grosso, 12 acessos de Santa Catarina e dois acessos coletados em mercados do Amazonas (Tabela 1).

Assim como outras espécies de inhame, *D. trifida* é considerada uma espécie subutilizada e mantida principalmente por pequenos e médios produtores (SIQUEIRA, 2011b). Desta forma, fez-se necessário uma caracterização socioeconômica no momento das coletas, a fim de adquirir dados que auxiliem na composição do perfil desses agricultores. Dos agricultores entrevistados e responsáveis pela manutenção das atividades agrícolas relacionadas ao cultivo de inhame, 75% eram homens e 25% mulheres. A média de idade foi de 59,5 anos ($40 \leq n \leq 79$), sendo 62 anos a idade média das mulheres e 59 anos a idade média dos homens.

Ao contrário dos primórdios da agricultura, onde o homem era responsável pela caça e pesca, e a mulher pelo plantio e colheita, atualmente observa-se que a maioria dos responsáveis pelas atividades agrícolas é do sexo masculino, embora todos os membros da família estejam envolvidos. Isto ocorre devido às atividades relacionadas à agricultura serem bastante laboriosas e apresentarem baixo retorno financeiro, indicando que o cultivo de inhame é caracterizado por pouco envolvimento das mulheres nas atividades de campo (TAMIRU et al., 2008).

De modo semelhante, observa-se um número reduzido de jovens e mão de obra disponível para as atividades agrícolas, sendo apenas uma média de três indivíduos por roça a quantidade de pessoas envolvidas com as atividades relacionadas à cultura de inhame. Como o inhame é uma

cultura de subsistência mantida pela agricultura familiar, apenas os membros da família, em geral com idade superior a 50 anos, estão envolvidos nessas atividades. Para Carneiro (2001) esta condição se torna um problema, porque a manutenção da agricultura familiar ocorre de forma endógena por subsídio da própria comunidade, sendo tradicionalmente o sucessor da unidade produtiva um dos integrantes da família. Logo, esta redução no número de jovens e escassez da mão de obra pode acarretar na diminuição desse tipo de agricultura ao longo das próximas gerações.

As unidades produtivas, onde se observou o cultivo de *D. trifida*, apresentaram roças com menos de dois hectares (92%), sendo seu plantio consorciado com outras espécies, sobretudo hortaliças, na maioria das vezes. Segundo Miller e Nair (2006), as roças são de fundamental importância para a conservação de variedades das espécies de inhame, bem como diversas outras plantas cultivadas, uma vez que uma alta biodiversidade, com múltiplas finalidades para os agricultores, é mantida nesses locais (SMITH, 1996).

Em relação às variedades cultivadas pelos agricultores visitados, 44% afirmaram ter adquirido a partir de familiares antecessores residentes no próprio local da coleta, sendo o plantio realizado com as túberas derivadas de materiais obtidos há algumas décadas e que foram repassados ao longo das gerações; cerca de 40% afirmaram cultivar variedades fornecidas por vizinhos do próprio local e 16% declararam não conhecer a procedência dos materiais. Como não existe um sistema formal de fornecimento de túberas-sementes, as variedades de *D. trifida* cultivadas nessas áreas são as mesmas mantidas há várias décadas e estas são trocadas entre os agricultores locais, sendo baixa a incidência de introdução de novas variedades provenientes de outras áreas. Esses dados corroboram com os estudos realizados por Tamiru et al. (2008), onde observaram que na Etiópia também não existia um sistema formal de fornecimento de túberas de inhame, bem como agricultores especializados na produção de materiais para o plantio.

Durante o período de coleta e posterior identificação dos materiais em casa de vegetação, foi possível observar que as túberas coletadas, algumas vezes, pertenciam a outras espécies de *Dioscorea*, principalmente *D. alata*. Foi possível observar também que cerca de 56% dos agricultores cultivavam apenas uma variedade de *D. trifida*, diferentemente do que ocorre com o cultivo de outras espécies de propagação vegetativa, como a mandioca (*Manihot esculenta*), a batata (*Solanum tuberosum*), a batata-doce (*Ipomoea batatas*) (BRUSH et al., 1981; SALICK et al., 1997; SAMBATTI et al., 2001; EMPERAIRE; PERONI, 2007; AMOROZO, 2008; VEASEY

et al., 2008; ALVES-PEREIRA et al., 2011), onde costuma-se manter duas ou mais variedades numa mesma propriedade rural. Esta diminuição no número de variedades de inhame mantidas pelos agricultores é preocupante por estar diretamente relacionada com a perda de recursos genéticos e o processo de erosão genética. Entretanto, de modo geral, foram encontradas diversas variedades de *D. trifida* mantidas pelos agricultores localizados na área de estudo, o que caracteriza o tipo de agricultura praticada nas regiões dos trópicos, onde diversas espécies cultivadas ou variedades da mesma espécie são mantidas em propriedades rurais de pequenos e médios agricultores (CLAWSON, 1985; BRUSH, 1995), em resposta a fatores econômicos, sociais, culturais e naturais (COX; WOOD, 1999).

Por outro lado, observou-se também que 44% dos agricultores plantam mais de uma variedade de *D. trifida*. Este procedimento visa dar maior garantia de colheita, pois caso algum estresse biótico ou abiótico venha interferir no plantio, dificilmente todas as variedades serão afetadas numa mesma intensidade, aumentando assim a probabilidade de se obter uma produção que garanta ao menos o sustento da família durante as condições adversas.

A perda de recursos genéticos também foi constatada quando 96% dos agricultores envolvidos na pesquisa afirmaram ter plantado variedades de inhame que atualmente deixaram de plantar. Os principais motivos relacionados pelos agricultores foram: abandono de roças com o intuito de obter vínculo empregatício em zonas urbanas, e assim garantir alguma fonte de renda mais estável à família; mudanças ocorridas nas condições físico-químicas do solo, propiciando o surgimento de doenças na cultura, e consequentemente perda total do plantio; favorecimento de uma variedade em detrimento de outras; diminuição de mão de obra disponível para desenvolver as atividades de preparo, plantio e colheita; má distribuição de terra, reduzindo intensamente a área disponível para as atividades agrícolas; falta de informações relacionadas ao manejo adequado da cultura, como meios de controle de doenças e pragas, possibilitando grandes perdas na época de colheita das túberas; bem como aumento do custo de produção, baixo retorno financeiro e falta de incentivo para estimular a prática da agricultura familiar.

Quando os agricultores continuam suas atividades no campo e mantêm as variedades de *D. trifida* nos sucessivos ciclos de plantio e colheita, estes realizam diversas práticas agrícolas com o intuito de aumentar a produção de túberas. Entre essas práticas, observou-se o uso de herbicida e adubos orgânico ou químico. Entretanto, houve diferenças no modo e na frequência de aplicação desses insumos entre os Estados visitados, onde apenas os agricultores de Santa Catarina

afirmaram utilizar algum tipo de implemento agrícola. Este fato é relevante, pois se pôde observar que os agricultores de Santa Catarina encontram-se mais preparados em termos de manejo e tratos dados ao cultivo de inhame, o que justifica a produção de até 2500 kg de inhame obtida em algumas propriedades visitadas com área acima de 2 ha, a maior produção encontrada nos Estados visitados. Esta produção está relacionada também com o fato das túberas de *D. trifida* serem muito apreciadas pelos produtores e consumidores da região, mais do que as túberas de *D. alata* e *D. cayenensis*, espécies de maior expressão econômica no Brasil. Inclusive, observou-se túberas de *D. trifida* sendo comercializadas em um supermercado local, bem como sendo servidas em um restaurante típico da região (VEASEY et al., 2010). De acordo com Ming², esta espécie apresenta também interesse comercial na Amazônia, sendo a principal espécie do gênero *Dioscorea* comercializada em feiras e mercados locais (informação verbal), como os dois acessos da Amazônia avaliados neste estudo.

Como o inhame é considerado uma cultura subutilizada e de subsistência, é bastante notável a falta de informação relacionada ao manejo e suas potencialidades de uso, como enfatizado pelos próprios agricultores, bem como o atraso na industrialização do inhame no Brasil. Estes fatores são reflexos do funcionamento precário das atividades inerentes à produção agrícola, de um lado, e à falta de diversificação no consumo, do outro (CHU; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1991).

Em outras partes do mundo, como na África e na Ásia, embora já ocorra substancial diversificação no consumo, especialmente através de significativo aproveitamento industrial ou artesanal do inhame, o nível tecnológico é baixo e os produtos elaborados não ultrapassam fronteiras pela falta de qualidade, prestando-se tão somente ao consumo local ou regional. Santos (1996) afirma que para a cultura do inhame alcançar altas produtividades, necessita de condições edafoclimáticas favoráveis durante todo o seu ciclo vegetativo e reprodutivo, principalmente disponibilidade adequada de luminosidade e água. Porém, os fatores que mais limitam e condicionam a sua produção estão associados à baixa fertilidade natural do solo utilizado para o cultivo de inhame e ao manejo inadequado da cultura diretamente relacionado com agricultura familiar e tradicional (CHU; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1991). Assim, a disponibilidade de inhame para industrialização no Brasil é pouco expressiva por não existir uma definição sobre os

²MING, L.C. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu.

tipos de produtos mais recomendados para então serem selecionadas as variedades apropriadas a cada situação ou exigência de mercado. Verifica-se, portanto, que o interesse local dos próprios agricultores é o fator principal de seleção e a força propulsora para a manutenção das variedades das espécies de inhame, principalmente *D. trifida*, cujo cultivo e manutenção são praticados exclusivamente por agricultores brasileiros e alguns outros países da América Latina, como Suriname e Guiana Francesa (BOUSALEM et al., 2010).

5.3.2 Diversidade morfológica e nomenclatura

As variedades de inhame encontradas sob cultivo recebem diversas denominações pela comunidade local, que consideram uma combinação de caracteres morfológicos, organolépticos e de adaptação ecológica para classificá-las, e talvez estes sejam os principais critérios utilizados para selecionar as variedades que são mantidas ao longo do tempo (TAMIRU et al., 2008). Ao contrário do que afirma Stephens (2009), onde “cará doce” é a única denominação para *D. trifida* no Brasil, observou-se neste estudo que dentre as denominações encontradas para a espécie, as mais citadas foram o “cará roxo”, em 43,4% das unidades amostrais, o “cará” e o “cará branco”, ambos observados em 9,4% e o “cará mimoso”, com 7,6%. Observou-se também uma regionalização dessas denominações, onde “cará roxo” foi atribuído à espécie pelos agricultores do Estado de São Paulo, Mato Grosso e Amazonas; “cará”, no Amazonas e Santa Catarina; “cará branco”, em São Paulo e Mato Grosso; e “cará mimoso”, apenas em Santa Catarina. Além dessas, várias outras denominações para a espécie foram encontradas, porém com baixa frequência (Tabela 3).

A partir da caracterização morfológica, observou-se que todos os acessos de *D. trifida* coletados apresentaram pecíolos de coloração verde com pigmentos marrom; caule poligonal alado, característica específica de planta trepadeira, pois a presença de asas membranosas no caule facilita sua fixação durante o crescimento; ausência de espinho, ao contrário de *D. cayenensis* e *D. rotundata*, espécies bastante cultivadas, principalmente no nordeste e sudeste do Brasil (VEASEY et al., 2010); direção de crescimento anti-horário, característica exclusiva das espécies de *Dioscorea* da seção *Macrogynodium*, na qual *D. trifida* é a única espécie importante economicamente do grupo (LEBOT, 2009); e túberas subterrâneas, como a maioria das espécies do gênero *Dioscorea*.

Tabela 3 - Nomes populares para *Dioscorea trifida* L. dado pelos agricultores dos Estados do Mato Grosso, Santa Catarina, São Paulo e Amazonas, Brasil

Nome popular	(%)	Número de citações por Estado			
		MT	SC	SP	AM
Cará roxo	43,40	7	-	15	1
Cará	13,20	-	6	-	1
Cará branco	9,43	1	-	4	-
Cará mimoso	7,55	-	4	-	-
Cará São João branco	3,77	-	-	2	-
Cará São João roxo	3,77	-	-	2	-
Cará mão de anta	3,77	2	-	-	-
Cará pão	1,89	-	1	-	-
Calcanhar de negro	1,89	-	1	-	-
Cará pipa	1,89	-	-	1	-
Cará pé de anta	1,89	1	-	-	-
Cará do Joaquim	1,89	1	-	-	-
Pombinho branco	1,89	1	-	-	-
Cará cobrinha	1,89	-	-	1	-

Todos os acessos apresentaram folhas lobadas e a maioria apresentou folhas alternadas com cinco lóbulos, exceto os acessos 40 e 41 coletados em Acorizal, Mato Grosso, que apresentaram apenas três lóbulos (Figura 3A e B). Estes podem pertencer a outra espécie, ou variedade de *D. trifida*, entretanto devido à sua grande similaridade morfológica com os outros acessos, provavelmente os acessos 40 e 41 são produtos de mutação no gene responsável pela determinação do número de lóbulos.

Grande parte dos acessos apresentou caule verde com presença de pigmentos roxo, exceto os acessos 01, 02, 03, 07, 09, 10 e 14, coletados em Ubatuba, São Paulo e os acessos 48 e 50, coletados em Rosário do Oeste, Mato Grosso, que apresentaram caule verde com pigmentação marrom. Bressan (2005) concluiu que as unidades de cultivo têm uma grande influência sobre os caracteres morfológicos, pois os agricultores de comunidades mais próximas cultivam variedades com aspectos morfológicos mais similares.

Quanto à largura da folha, esta variou de 8,10 cm a 22,37 cm, com média de 14,91 cm. O diâmetro do caule variou de 1,26 mm a 8,35 mm, com média de 4,63 mm, que junto com o comprimento do pecíolo, variando de 4,95 cm a 15,17 cm e média de 9,36 cm, foram os caracteres de maior variação, com desvio padrão de 6,26 mm e 9,65 cm, respectivamente (Tabela

4). Vale ressaltar que esses caracteres são quantitativos e por este motivo, altamente influenciados pelo local de cultivo, sofrendo grandes alterações decorrentes de variantes ambientais (VENKOVSKY; BARRIGA, 1992).

Tabela 4 - Valores máximo e mínimo, média e desvio padrão das características quantitativas avaliadas em *Dioscorea trifida* L.

Caracteres	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Diâmetro do caule (mm)	1,26	8,35	4,63	6,26
Largura da folha (cm)	8,10	22,37	14,91	3,08
Comprimento do pecíolo (cm)	4,95	15,17	9,36	9,65
Número de túberas	1,00	25,00	8,19	5,21
Número de lóbulos	3,00	5,00	-	-

Os descritores mais importantes para diferenciação dos acessos foram aqueles referentes às túberas, principalmente a cor da casca e polpa (Figuras 4C, 4D, 4E; Figura 5). Verificou-se que cerca de 68% dos materiais avaliados apresentaram casca marrom e 32% casca amarela. Enquanto que, em relação à coloração da polpa, 42% dos materiais apresentaram polpa branca e 24% polpa roxa. Entretanto, 34% dos materiais apresentaram polpa com mistura de diversas tonalidades de roxo e branco, principalmente os materiais coletados em Ubatuba, São Paulo (Figura 4D). Características relacionadas às túberas, na maioria das vezes, são responsáveis pelo nome das diferentes variedades de inhame atribuídos pelos agricultores, tais como "cará roxo", "cará branco", entre outros. Ainda em relação às túberas, parte da planta mais importante comercialmente, foi obtida uma média de 8 túberas/planta, variando de 1 túbera (acessos 30 de Joinville, Santa Catarina; 35 de Iguape, São Paulo; e 40 de Acorizal, Mato Grosso) a 25 túberas (acesso 16, coletado em Ubatuba, São Paulo).

Por se tratar de uma espécie de propagação vegetativa e mantida principalmente pela agricultura familiar, já é esperado certo grau de homogeneidade desses materiais, como indicado pela caracterização morfológica, embora tenha se observado variações entre os mesmos. Entretanto, a troca de túberas entre os agricultores é prática comum na comunidade tradicional. Em muitos casos, ocorre uma intensa troca de túberas entre comunidades próximas num sistema aberto e dinâmico, onde as redes locais existem e promovem o plantio de materiais em ambientes mais amplos e heterogêneos, muitas vezes implicando em viagens de longa distância, inclusive entre municípios (TESFAYE; LÜDDERS, 2003).

Figura 4 - Aspectos morfológicos das folhas e túberas dos acessos avaliados de *Dioscorea trifida* L. A) Folhas com três lóbulos; B) Folhas com cinco lóbulos; C) Túberas com polpa branca; D) Túberas com polpa roxa e branca; E) Túberas com polpa roxa. Fotos do autor.

Figura 5 - Frequências para cor da casca e polpa das túberas dos acessos avaliados de *Dioscorea trifida* L.

5.4 Conclusões

Conclui-se nesse estudo, que a espécie *D. trifida* é cultivada e consumida pelas comunidades tradicionais dos Estados de São Paulo, Santa Catarina e Mato Grosso, e é comercializada no Estado do Amazonas. Na maioria dessas comunidades não existe um sistema formal de fornecimento de túberas-sementes, ocorrendo a troca de túberas entre os agricultores locais, e consequentemente baixa incidência de introdução de novas variedades provenientes de outras áreas.

A deficiência e a falta de informação relacionada ao manejo, potencialidades de uso e industrialização do inhame no Brasil são reflexos do funcionamento inadequado das atividades inerentes à produção agrícola e à falta de diversificação no consumo, ambos ocasionados pela falta de apoio político e financeiro para a manutenção de um sistema de produção, beneficiamento e comercialização de túberas.

Dada a importância desta cultura no contexto socioeconômico ao qual o cultivo de *D. trifida* está inserido, observa-se que há a necessidade urgente de quantificar a diversidade genética real da espécie mantida pelos agricultores brasileiros, a fim de facilitar a sua conservação, bem como sua utilização em programas de melhoramento. Estudos que relacionem os problemas enfrentados pela cultura do inhame podem melhorar o papel que esta cultura desempenha na segurança alimentar e assegurar a manutenção contínua da diversidade de inhame através da utilização crescente de variedades disponíveis.

Referências

- AMOROZO, M.C.M. Maintenance and management of agrobiodiversity in small-scale Agriculture. **Functional Ecosystems and Communities**, Syon, v. 2, p. 11-20, 2008.
- BOUSALEM, M.; VIADER, V.; MARIAC, C.; GOMEZ, R.; HOCHU, I.; SANTONI S.; DAVID, J. Evidence of diploidy in the wild Ameridian yam, a putative progenitor of the endangered species *Dioscorea trifida* (Dioscoreaceae). **Genome**, Ottawa, v. 53, p. 371-383, 2010.
- BRESSAN, E.A. **Diversidade isoenzimática e morfológica de inhame (*Dioscorea* spp.) coletados em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira – SP**. 2005. 172 p. Tese (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BRESSAN, E.A.; BRINER NETO, T.; ZUCCHI, M.I.; RABELLO, R.J.; VEASEY, E.A. Morphological variation and isozyme diversity in *Dioscorea alata* L. landraces from Vale do Ribeira, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 4, p. 494-502, 2011.
- _____. Genetic structure and diversity in *Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata* complex revealed by morphological and isozyme markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, 2013. No prelo.
- BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A.; PERONI, N.; FELIPIIM, A.P.; SANTOS, K.M.P. Collecting yam (*Dioscorea* spp.) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm in traditional agriculture small-holdings in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 144, p. 8-13, 2005.

BRUSH, S.B. In situ conservation of landraces in centers of diversity. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 3346-3354, 1995.

BRUSH, S.B.; CARNEY, H.J.; HUAMAN, Z. Dynamics of Andean potato agriculture. **Economic Botany**, New York, v. 35, p. 70-88, 1981.

CARMO, C.A.S. **Inhame e taro**: sistemas de produção familiar. Vitória: INCAPER, 2002. 289 p.

CARNEIRO, M.J. Herança e gênero entre agricultores familiares. **Revista Estudos Feministas**, Florianópolis, v. 9, p. 22-55, 2001.

CHU, E.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Native and exotic species of *Dioscorea* used as food in Brasil. **Economic Botany**, New York, v. 45, p. 467-479, 1991.

CLAWSON, D.L. Harvest security and intraspecific diversity in traditional tropical agriculture. **Economic Botany**, New York, v. 39, p. 56-67, 1985.

COX, T.X.; WOOD, D. The nature and role of crop biodiversity. In: WOOD, D.; LENNE, J.M. **Agrobiodiversity**: characterization, utilization and management. Wallingford: CAB International, 1999.

EMPERAIRE, L.; PERONI, N. Traditional management of agrobiodiversity in Brazil: a case study of manioc. **Human Ecology**, New York, v. 35, p. 761-768, 2007.

FERREIRA, A.B.; MING, L.C.; CHECHETTO, F.; P. Dioscoreáceas cultivadas por agricultores da Baixada Cuiabana em Mato Grosso - Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 6, p. 201-208, 2010.

GOVAERTS, R.; WILKIN, P.; SAUNDERS, R.M.K. **World checklist of Dioscoreales, yam and their allies**. Kew: Kew Publishing and Royal Botanic Gardens, 2007. 65 p.

HASAN, S.M.Z.; NGADIN, A.N.; SHAH, R.M.; MOHAMAD, N. Morphological variability of greater yam (*Dioscorea alata* L.) in Malaysia. **Plant Genetic Resources Characterization and Utilization**, Cambridge, v. 6, p. 52-61, 2008.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE/INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE. **Descritores para el ñame (*Dioscorea* spp.)**. Roma, 1997. 61 p.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops**: cassava, sweet potato, yams and aroids. London: CABI North American, 2009. 413 p.

MELO FILHO, P.A.; SANTOS, R.C.; MAFRA, R.C.; SANTOS, J.W.; ANUNCIAÇÃO FILHO, C.J. Classificação de germoplasma de *Dioscorea* sp. através da análise das componentes principais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 619-623, 2000.

MIGNOUMA, H.D.; DANSI, A.; ZOK, S. Morphological and isozymic diversity of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*Dioscorea rotundata* complex) of Cameroon. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 49, p. 21–29, 2002.

MILLER, R.P.; NAIR, P.K.R. Indigenous agroforestry systems in Amazonia: from prehistory to today. **Agroforestry Systems**, Amsterdam, v. 66, p. 151–164, 2006.

PEDRALLI, G. O inhame, esse desconhecido. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 8, p. 58–62, 1988.

_____. A família *Dioscoreaceae* (R.Br.) Lindley no Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Pesquisa**, Santa Cruz do Sul, v. 4, p. 43–77, 1992.

_____. Distribuição geográfica e taxonomia das famílias Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. In: CARMO, C.A.S. **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória: INCAPER, 2002. p. 15–26

RAMOS-ESCUADERO, F.; SANTOS-BUELGA, C.; PÉREZ-ALONSO, J.J.; YÁÑES, J.A.; DUEÑAS, M. HPLC-DAD-ESI/MS identification of anthocyanins in *Dioscorea trifida* L. yam tuber (purple sachapapa). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, p. 745–752, 2010.

SANTOS, E.S. **Inhame**(*Dioscorea spp*): aspectos básicos da cultura. João Pessoa: SEBRAE, 1996. 158 p.

SALICK, J.; CELLINESE, N.; KNAPP, S. Indigenous diversity of cassava: generation, maintenance, use, and loss among the Amuesha, Pernian Upper Amazon. **Economic Botany**, New York, v. 51, p. 6–19, 1997.

SAMBATTI, J.B.M.; MARTINS, P.S; ANDO, A. Folk taxonomy and evolutionary dynamics of cassava: a case study in Ubatuba, Brazil. **Economic Botany**, New York, v. 55, p. 93–105, 2001.

SIQUEIRA, M.V.B.M. Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 16–20, 2011.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; VEASEY, E.A. Raíces y tubérculos tropicales olvidados o subutilizados en Brasil. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, Bogotá, v. 3, p. 110–125, 2009.

SMITH, N.J.H. Home gardens as a springboard for agroforestry development in Amazonia. **International Tree Crops Journal**, Bicester, v. 9, p. 11–30, 1996.

STEPHENS, J.M. **Cushcush** – *Dioscorea trifida* L. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/mv057>>. Acesso em: 27 dez. 2009.

TAMIRU, M.; BECKER, H.C.; MASS, B.L. Diversity, distribution and management of yam landraces (*Dioscorea spp.*) in Southern Ethiopia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, p. 115–131, 2008.

TESFAYE, B.; LÜDDERS, P. Diversity and distribution patterns of enset landraces in Sidama, Southern Ethiopia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, p. 359-371, 2003.

VEASEY, E.A.; BORGES, A.; ROSA, M.S.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Genetic diversity in Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Solanales, Convolvulaceae) landraces assessed with microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 725-733, 2008.

VEASEY, E.A.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; SILVA, L.R.G.; NASCIMENTO, W.F.; FERREIRA, A.B.; SILVA, D.; SILVA, E.; MING, L.C.; PERONI, N.; SANTOS, A.H. 2010. Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas brasileiros. In: KFFURI, C.W.; AMOROZO, M.C.M.; MING, L.C. (Org.). **Agrobiodiversidade no Brasil: experiências e caminhos da pesquisa**. Recife: NUPEEA, 2012. p.45-74.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 494 p.

6 DIVERSIDADE GENÉTICA ESPACIALMENTE ESTRUTURADA DO INHAME AMERÍNDIO BRASILEIRO (*Dioscorea trifida* L.) AVALIADA POR MARCADORES SSR E ISSR

Resumo

Dioscorea trifida L. (Dioscoreaceae) é uma das espécies de inhame originária da América mais importante economicamente, cuja origem e domesticação são ainda assuntos controversos. No intuito de estimar a diversidade genética de *D. trifida* mantida pelos agricultores tradicionais do Brasil, 53 acessos de 11 municípios dos Estados São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso e Amazonas foram caracterizados com base em oito marcadores SSR e 16 ISSR. O nível de polimorfismo entre os acessos foi alto, 95% para SSR e 75,8% para ISSR. O marcador SSR, quando comparado com ISSR, demonstrou maior poder de discriminação entre os acessos, com os valores do índice *D* variando de 0,79 and 0,44, respectivamente. Embora os marcadores SSR e ISSR tenham permitido a formação de dendrograma com diferentes topologias, ambos separaram os acessos em três grupos principais: I –Ubatuba-SP; II –Iguape-SP e Santa Catarina; III - Mato Grosso. Os acessos do Estado do Amazonas foram classificados no grupo II com SSR e em um grupo separado com ISSR. As análises de agrupamento, coordenadas principais e Bayesiana, conduzidas para ambos marcadores, corroboraram a classificação em três grupos principais. Foi observada maior variação genética dentro dos grupos formados (66,5% e 60,6% para ISSR e SSR, respectivamente), e maior índice de diversidade de Shannon para o grupo II com SSR. Foram encontradas correlações baixas, mas significativas entre as distâncias genéticas e geográficas ($r = 0,08$; $p = 0,0007$ para SSR e $r = 0,16$; $p = 0,0002$ para ISSR). Portanto, os resultados de ambos os marcadores demonstraram que os acessos de *D. trifida* mantidos por pequenos agricultores tradicionais no Brasil apresentaram uma diversidade genética levemente estruturada no espaço geográfico amostrado.

Palavras-chave: Agricultura tradicional; Estrutura genética; Inhame; Marcadores moleculares;

Abstract

Dioscorea trifida L. (Dioscoreaceae) is among the economically most important cultivated Amerindian yam species, whose origin and domestication are still unresolved issues. In order to estimate the genetic diversity maintained by traditional farmers in Brazil, 53 accessions of *D. trifida* from 11 municipalities in the states of São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso and Amazonas were characterized based on eight SSR and 16 ISSR markers. The level of polymorphism among the accessions was high, 95% for SSR and 75.8% for ISSR. The SSR marker showed higher discrimination power among accessions compared to ISSR, with *D* parameter values of 0.79 and 0.44, respectively. Although SSR and ISSR markers led to dendrograms with different topologies, both separated the accessions into three main groups: I – Ubatuba-SP; II – Iguape-SP and Santa Catarina; and III - Mato Grosso. The accessions from Amazonas State were classified in group II with SSR and in a separate group with ISSR. Bayesian, cluster and principal coordinate analyzes conducted with both molecular markers corroborated the classification into three main groups. Higher variation was found within groups in the AMOVA analysis for both markers (66.5% and 60.6% for ISSR and SSR, respectively), and higher Shannon diversity index was found for group II with SSR. Significant but low correlations were found between genetic and geographic distances ($r = 0.08$; $p = 0.0007$ for SSR

and $r = 0.16$; $p = 0.0002$ for ISSR). Therefore, results from both markers showed a slight spatially structured genetic diversity in *D. trifida* accessions maintained by small traditional farmers in Brazil.

Keywords: Genetic structure; Molecular markers; Traditional agriculture; Yams

6.1 Introdução

As denominações populares “inhame” e “cará” são utilizadas para várias espécies de monocotiledôneas do gênero *Dioscorea* (família Dioscoreaceae), que constituem importantes fontes de alimento nas regiões úmidas e subúmidas dos trópicos (BURKILL, 1960; AYENSU; COURSEY, 1972). Este gênero é formado por 59 Seções que reúnem 616 espécies (KNUTH, 1924), das quais apenas dez são utilizadas no consumo humano (LEBOT, 2009). Dentre as espécies mais importantes economicamente, *D. cayenensis* Lam. e *D. rotundata* Poir. são originárias da África, *D. alata* L. e *D. bulbifera* L., originárias da Ásia, e *D. trifida* L., originária da América do Sul (COURSEY, 1976).

Há grandes controvérsias em relação à história evolutiva de *D. trifida*. Embora a espécie ocorra com grande frequência em diversos países da América Latina, e a Amazônia tenha sido reportada como o possível centro de origem e diversificação da espécie, ainda é bastante evidente a falta de informações sobre sua origem e processo de domesticação (DEGRAS, 1993). Acredita-se que *D. trifida* originou-se na fronteira entre Brasil, Guiana, Suriname e Guiana Francesa, sendo domesticada pelos povos indígenas dessas regiões (PEDRALLI, 1998). Estudos recentes realizados na Guiana Francesa identificaram a presença de possíveis parentais selvagens de *D. trifida*, sendo as primeiras evidências genéticas diretas dos possíveis locais de origem da espécie (BOUSALEM et al., 2010).

Na Amazônia, Clement (1999) propôs a existência de diversas áreas com grandes concentrações de recursos genéticos de várias culturas, e *D. trifida* encontra-se presente em algumas dessas áreas, tais como Centro do Noroeste Amazônico, Centro da Amazônia Central, Região Estuarina da Amazônia, Centro Menor do Orinoco Médio, Centro Menor da Guiana e Região Costeira da Guiana, indicando estreita relação entre essas áreas com a história evolutiva da espécie. Em escavações arqueológicas no Panamá foram encontrados restos de tubérculos de *D. trifida* juntamente com mandioca (PIPERNO et al., 2000; DICKAU et al., 2007). Como a mandioca foi domesticada no Sudoeste da Bacia Amazônica (OLSEN, 2004) e rapidamente se difundiu por toda América Tropical (PIPERNO et al., 2000; DICKAU et al., 2007), *D. trifida*

poderia ter sido domesticada e propagada pelas mesmas tribos envolvidas com o processo de domesticação da mandioca (BOUSALEM et al., 2010), sendo possivelmente a primeira espécie de inhame cultivada pelos povos indígenas na Amazônia (DEGRAS, 1993). O cultivo de *D. trifida* no Brasil tem sido realizado desde então, principalmente por pequenos agricultores rurais (PEDRALI, 1998). Em pesquisas recentes, foi observada a ocorrência desta espécie no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (BRESSAN et al., 2005; VEASEY et al., 2010), e é considerada também uma importante fonte de alimento na Amazônia (VELEZ, 1998).

D. trifida é uma planta herbácea, autotetraplóide ($x = 20$ e $2n = 4x = 80$), trepadeira e perene (BOUSALEM et al., 2006), com caule quadrangular alado e sem espinhos, tendo as folhas profundamente lobuladas, dispostas geralmente de forma alternadas ou raramente opostas (MONTALDO, 1991). São plantas dióicas, com flores pequenas unissexuadas, que quando fecundadas apresentam frutos capsulados não comestíveis (STEPHENS, 2009). Sua reprodução ocorre por alogamia ou propagação vegetativa (MONTALDO, 1991). Os tubérculos, estrutura da planta normalmente consumida pelas comunidades, são subterrâneos, redondos ou cônicos, com polpa branca, amarela ou púrpura, tamanho variando de 20 a 40 cm de comprimento e peso de 80 a 150 g (LEBOT, 2009). A planta, principalmente os tubérculos, possui alta qualidade nutritiva e propriedades adstringente, antimicrobiana e diurética, o que permite seu uso no combate a desnutrição e tratamento de doenças como diabetes e redução de colesterol (RAMOS-ESCUDEIRO et al., 2010). O principal fator limitante para o desenvolvimento de *D. trifida* é o potyvirus (gênero *Potyvirus*, família Potyviridae), que ocasiona uma variedade de sintomas nas folhas das plantas infectadas afetando seu crescimento (ODU et al., 2004), estando diretamente relacionado com o dano econômico significativo e processo de erosão genética da cultura (BOUSALEM et al., 2010).

Apesar da importância geocultural e socioeconômica do inhame, poucos estudos são realizados para explorar de modo sustentável as potencialidades do inhame e elaborar estratégias de conservação desta cultura (BOUSALEM et al., 2006). No Brasil, ainda são poucas as instituições atualmente envolvidas com pesquisas relacionadas à cultura do inhame, de modo que quaisquer novos estudos são importantes para programas de melhoramento e estratégias de conservação. Como o cultivo e o consumo de *D. trifida* são bastante intensos dentro de um sistema de agricultura familiar praticada por populações tradicionais, esses locais fornecem um cenário propício para a geração e manutenção da diversidade genética da espécie (VEASEY et

al., 2010). Entretanto, as pressões socioeconômicas sofridas pelos agricultores nos últimos anos, vem favorecendo a perda dos recursos genéticos vegetais, especificamente de *D. trifida*, cujos danos causados podem ser intensos e irreversíveis (BRASIL, 2006). Neste contexto, observa-se a necessidade de estimar a diversidade genética de *D. trifida* mantida pelos agricultores tradicionais a fim de auxiliar na elaboração de estratégias de conservação da diversidade da espécie, bem como diminuir os danos causados por essas pressões socioeconômicas à cultura do inhame.

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética de populações de plantas naturais e cultivadas ao nível de DNA, além de marcadores morfológicos. Dentre essas técnicas os marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), são bastante eficientes, pois são codominantes, multialélicos e altamente polimórficos (OLIVEIRA et al., 2006). A fim de estudar a diversidade genética de *Dioscorea*, Tostain et al. (2006) desenvolveram iniciadores de microssatélites para as espécies *D. alata*, *D. praehensilis* Benth e *D. abyssinica* Hochst. ex Kunth, onde foi avaliada também a transferibilidade destes iniciadores para outras espécies, tais como: *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. bulbifera*, *D. nummularia* Lam. e *D. trifida*. Estes *primers* foram utilizados por Veasey et al. (2012) para avaliar 12 acessos de *D. trifida* provenientes de diferentes regiões do Brasil, como São Paulo, Mato Grosso e Amazonas. Siqueira et al. (2011b) desenvolveram dez *primers* de SSR para *D. alata*, avaliando a transferibilidade para outras espécies, incluindo *D. trifida*. Silva et al. (2013) também desenvolveram nove *primers* de SSR para *D. cayenensis*, com transferibilidade para *D. rotundata*. Hochu et al. (2006) desenvolveram oito *primers* de SSR específicos de *D. trifida*, que foram utilizados para análise de 24 cultivares desta espécie, observando alto polimorfismo entre os mesmos. Estes *primers* foram utilizados por Bousalem et al. (2006) para avaliar o padrão de herança de *D. trifida*, a partir da análise dos genótipos parentais e da progênie, onde foi relatado o comportamento tetraplóide para a espécie.

Outro marcador utilizado em estudos de diversidade genética é o ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), que representa uma das classes de marcadores moleculares mais recentes, desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Os marcadores ISSR são dominantes, multialélicos e com alto padrão de polimorfismo (WOLFE, 2005). No gênero *Dioscorea* alguns estudos de diversidade genética têm sido realizados com base no marcador molecular ISSR. Dentre esses, Zhou et al. (2008), analisaram o nível de diversidade genética entre diferentes

cultivares de *D. opposita* Thunb, muito utilizada na medicina tradicional chinesa. Os resultados obtidos sugeriram que essas cultivares de inhame chinês tem uma valiosa fonte de genes a ser explorado. Wu et al. (2009) avaliaram a relação e variabilidade genética entre acessos de *D. alata*, e observaram um nível de diversidade bastante elevado, fornecendo o apoio da biologia molecular para distinção entre os acessos e melhoramento de *D. alata*. Os dois estudos demonstraram que os marcadores ISSR permitem uma avaliação satisfatória da diversidade genética de inhame e fornecem informações relevantes que auxiliam a seleção de genitores em futuros programas de melhoramento de inhame.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar 53 acessos de *D. trifida* provenientes de comunidades tradicionais dos Estados de Santa Catarina, São Paulo, Mato Grosso e Amazonas, utilizando marcadores SSR e ISSR, com o intuito de verificar o nível de diversidade genética que está sendo mantido pelos agricultores do Brasil. O estudo descreve a estrutura genética de *D. trifida* mantida pelos agricultores tradicionais e a diversidade genética concentrada dentro dos diferentes locais amostrados.

6.2 Material e Métodos

Foram avaliados 53 acessos de *D. trifida* coletados em 11 municípios nos Estados de São Paulo (SP), Santa Catarina (SC), Mato Grosso (MT) e Amazonas (AM), localizadas entre as latitudes 14°43'S e 26°15'S e longitudes 44°05'O e 57°59'O (Figura 6; Tabela 5). Em cada município visitado a coleta foi realizada de modo a buscar a maior representatividade da variabilidade genética, levando-se em consideração caracteres morfológicos e informações dos agricultores. Três acessos (dois acessos do Amazonas e um de Ubatuba, SP) foram adquiridos em feiras locais. Os acessos foram coletados na forma de túberas, e foram cultivados em vasos acondicionados em casa-de-vegetação da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, localizada em Piracicaba, São Paulo, Brasil, onde folhas recém expandidas foram coletadas para posterior extração de DNA.

6.2.1 Extração e quantificação de DNA

A fim de aumentar o período de conservação e utilização das folhas sem que as mesmas perdessem a viabilidade, folhas jovens recém-expandidas foram coletadas e armazenadas a 4°C durante sete dias em gel CTAB, contendo 30 mg de CTAB, 350 mg NaCl e 70 mL de água

destilada, segundo metodologia desenvolvida por Van den Berg³ (informação verbal). Após este período, foi removido o excesso de gel presente nos fragmentos de tecido vegetal com o auxílio de um papel toalha. Em seguida, os fragmentos foram macerados em 1 mL de tampão STE [0,13 mg de Sacarose; 45 µL de Tris-HCL (1M); 150 µL de EDTA (0,5M), completando-se com H₂O destilada para o volume final de 1,5 mL] e submetidos à extração de DNA pela metodologia de Doyle e Doyle (1990). A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose a 1%, utilizando tampão de corrida TBE 10X, corado com brometo de etídio. A concentração final de 5 ng/ µL foi obtida para reações de PCR.

Figura 6 - Locais de coleta de *Dioscorea trifida* L. no Brasil. Os detalhes de cada acesso estão relacionados na Tabela 1

³ VAN DEN BERG, C. Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas.

Tabela 5 - Acessos de *Dioscorea trifida* L. utilizados neste estudo, incluindo número de identificação dos acessos (ID) no Banco de germoplasma, procedência, nome popular e coordenadas geográficas

(continua)

Acessos	ID	Procedência	Nome popular	Lat/ Long
01	180	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°15'S/44°01'O
02	181	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará branco	23°17'S/44°05'O
03	182	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°18'S/44°52'O
04	183	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°17'S/44°51'O
05	184	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°18'S/44°51'O
06	185	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°18'S/44°51'O
07	187	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará branco	23°18'S/44°51'O
08	191	Sertão das Cutias, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°22'S/44°58'O
09	193	Rio Escuro, Ubatuba, São Paulo	Cará branco	23°28'S/45°08'O
10	195	Sertão do Ingá, Ubatuba, São Paulo	Cará cobrinha	23°31'S/45°13'O
11	196	Sertão do Ingá, Ubatuba, São Paulo	Cará branco	23°31'S/45°13'O
12	197	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°17'S/44°51'O
13	198	Sertão do Ingá, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°31'S/45°13'O
14	201	Sertão do Ingá, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°31'S/45°14'O
15	203	Sertão do Ingá, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°31'S/45°14'O
16	204	Rio Escuro, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°28'S/45°08'O
17	208	Araribá, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°32'S/45°15'O
18	210	Sertão de Ubatumirim, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°29'S/45°10'O
19	216	Fazenda da Caixa, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°31'S/45°14'O
20	217	Feira de Ubatuba, Ubatuba, São Paulo	Cará roxo	23°27'S/45°09'O
21	236	Feira de Manaus, Manaus, Amazonas	Cara roxo	03°08'S/60°01'O
22	237	Feira de Barcelos, Barcelos, Amazonas	Cará	0°58'S/62°55'O
23	281	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Cará	26°10'S/48°55'O
24	282	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Cará mimoso	26°09'S/48°56'O
25	283	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Cará	26°09'S/48°58'O
26	285	Acaraí, São Francisco do Sul, Santa Catarina	Cará pão	26°11'S/48°53'O
27	286	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Cará mimoso	26°15'S/48°37'O
28	287	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Carcanhá de nego	26°09'S/48°59'O
29	290	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Cará mimoso	26°09'S/48°59'O
30	292	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Cará	26°09'S/48°59'O
31	297	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Cará	26°09'S/48°59'O
32	298	Rio da Prata, Joinville, Santa Catarina	Cará	26°11'S/48°58'O
33	301	Rio da Prata, Joinville, Santa Catarina	Cará mimoso	26°11'S/48°58'O
34	302	Pirabeiraba, Joinville, Santa Catarina	Cará	26°10'S/48°57'O
35	312	Icapara, Iguape, São Paulo	Cará São João branco	24°40'S/47°27'O
36	313	Cavalcanti, Iguape, São Paulo	Cará-pipa	24°43'S/47°45'O
37	323	Icapara, Iguape, São Paulo	Cará São João roxo	24°40'S/47°27'O
38	328	Momuna, Iguape, São Paulo	Cará São João roxo	24°42'S/47°40'O

Tabela 5 - Acessos de *Dioscorea trifida* L. utilizados neste estudo, incluindo número de identificação dos acessos (ID) no Banco de germoplasma, procedência, nome popular e coordenadas geográficas

(conclusão)				
Acessos	ID	Procedência	Nome popular	Lat/ Long
39	329	Momuna, Iguape, São Paulo	Cará São João branco	24°42'S/48°40'O
40	335	Carumbé, Acorizal, Mato Grosso	Cará roxo	15°08'S/56°12'O
41	336	Carumbé, Acorizal, Mato Grosso	Cará roxo	15°08'S/56°12'O
42	340	Rio dos Couros, Cuiabá, Mato Grosso	Cará pé de anta	15°36'S/55°48'O
43	343	Carumbé, Acorizal, Mato Grosso	Cará branco	15°08'S/56°12'O
44	344	Sela Dourada, Nobres, Mato Grosso	Cará do Joaquim	15°36'S/56°48'O
45	345	Santo Antônio do Barreiro, Jangada, Mato Grosso	Cará roxo	15°08'S/56°17'O
46	350	Sela Dourada, Nobres, Mato Grosso	Cará branco	15°34'S/56°46'O
47	351	Sela Dourada, Nobres, Mato Grosso	Cará mão de anta	15°30'S/56°42'O
48	352	Timbozal, Rosário Oeste, Mato Grosso	Cará mão de anta	14°51'S/56°23'O
49	355	Chapada Vacaria, Acorizal, Mato Grosso	Cará roxo	15°03'S/56°08'O
50	361	Sela Dourada, Nobres, Mato Grosso	Cará roxo	14°43'S/56°15'O
51	364	Barranco Alto, Rosário Oeste, Mato Grosso	Pombinho branco	15°14'S/57°59'O
52	366	Sela Dourada, Nobres, Mato Grosso	Cará roxo cumprido	14°43'S/56°15'O
53	368	Barranco Alto, Rosário Oeste, Mato Grosso	Cará roxo	15°17'S/57°50'O

6.2.2 Amplificação de SSR e ISSR

Para amplificação dos locos SSR, foram testados oito *primers* específicos de *D. trifida* desenvolvidos por Hochu et al. (2006) e dois *primers* heterólogos desenvolvidos por Tostain et al. (2006), totalizando dez *primers* de SSR (Tabela 6). Esses locos foram amplificados em um volume final de 16 µL de reação de PCR contendo: 20 ng de DNA genômico diluído em reação tampão 5X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs, 5 pmoles de *primer* forward, 5 pmoles de *primer* reverse e 1 U/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA). A reação de amplificação foi realizada em termociclador MyCycler Thermal Cycler da BioRad, seguindo as seguintes condições de amplificação:

1) desnaturação a 94°C por 5 min, seguido de 10 ciclos de pré-amplificação [30 s a 94°C, 30 s na temperatura de anelamento, diminuindo 1°C a cada ciclo, iniciando em 60°C para o programa *TouchDown60* e em 50°C para o programa *TouchDown50* e 30 s a 72°C], seguidos de 30 ciclos de desnaturação (30 s a 95°C, 30 s a 50°C e 50 s a 72°C) e uma fase final de extensão de 5 min a 72°C para as reações de PCR com *primers* específicos; 2) desnaturação a 94°C por 5 min, seguido de 10 ciclos de pré-amplificação [30 s a 94°C, 30 s na temperatura de anelamento, diminuindo 1°C a cada ciclo, iniciando em 60°C para o programa *TouchDown60* e em 50°C para o programa *TouchDown50* e 30 s a 72°C], seguidos de 30 ciclos de desnaturação (30 s a 95°C, 30 s a 50°C e 50 s a 72°C) e uma fase de extensão final de 8 min a 72°C para reações de PCR com *primers* heterólogos.

A eletroforese foi realizada em gel desnaturante de poliacrilamida a 7%, com uma potência constante de 70 W durante o tempo necessário para separação dos fragmentos amplificados em cada *primer*, utilizando-se como marcador o DNA *ladder* de 10 pb e 100 pb (InvitrogenTM, São Paulo, Brazil). O gel foi corado utilizando a metodologia de nitrato de prata (CRESTE et al., 2001) para a revelação das bandas de microssatélites, as quais foram fotografadas em câmera digital e avaliadas em transluminador.

Para a análise dos marcadores ISSR, foram testados 20 *primers*, obtidos a partir do protocolo de Wolfe (2000) (Tabela 7). As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 30 µL contendo: 1,5 µL de DNA genômico (5 ng/µL) diluído em uma reação tampão 5X, 2,0 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs, 10 pmoles de *primer* e 1 U/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA). A amplificação do DNA molde foi realizada em termociclador Multigene Thermal Cycler (Labnet International, Inc.) seguindo as seguintes condições de amplificação: 90 s a 94°C, 35 ciclos de 94°C a 40 s, seguido de 46 ciclos (52°C por 45 s, 72°C por 90 s, 94°C por 45 s e 44°C por 45 s) e uma fase de extensão final de 72°C por 5 min (WOLFE, 2000).

Os produtos resultantes da reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 10X por 140 min a 90 V e corado com brometo de etídio. Para auxiliar a análise das bandas, foi utilizado como marcador 3 µL de DNA Ladder 100 pb (InvitrogenTM, Carlsbad, USA). Adicionalmente, foram utilizadas como controle amostras previamente amplificadas com sucesso. Após a corrida eletroforética, o gel foi fotografado sob fonte de luz ultravioleta com sistema de fotodocumentação Syngene (Synoptics Ltda.,

Cambridge, United Kingdom). Para a análise estatística dos dados foram consideradas apenas as bandas robustas e inequívocas. Foram descartadas as bandas que apresentaram baixa intensidade ou coalescentes com outras bandas.

6.2.3 Análises estatísticas

Devido à constatação de que a espécie *D. trifida* é tetraploide, conforme descrito por Bousalem et al. (2006), os padrões de bandas tanto da análise de marcadores SSR, como de ISSR foram interpretados como dados binários, presença (1) e ausência (0) de bandas, sendo assim geradas as matrizes de dados que foram submetidas aos programas estatísticos para obtenção dos parâmetros genéticos. A análise de diversidade genética foi realizada com base no Software POPGENE, versão 1.3 (YEH et al., 1997), onde foram obtidos os dados de número de bandas observadas por loco, número de bandas polimórficas, porcentagem de polimorfismo e estimado o índice de Shannon. Este índice foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $H' = -\sum_{i=1}^S p_i \log p_i$, onde, p_i : frequência de cada espécie, para i variando de 1 a S (riqueza).

Com o propósito de comparar a eficiência dos marcadores na identificação genotípica, o Parâmetro D (*Discriminating Power*) foi estimado para cada *primer*, como proposto por Tessier et al. (1999). Este parâmetro foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $D_j = 1 - C_j = 1 - \sum_{i=1}^I p_i \frac{(Np_i - 1)}{N - 1}$, onde D é a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente tenham um padrão de bandas diferente e distinto de outro; C é a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente tenham um padrão de banda idêntico; e N é igual ao número de indivíduos analisados.

O software DARwin, versão 5.0 (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006) foi utilizado para realizar as análises de agrupamento, obtendo-se assim os dendrogramas a partir do coeficiente de Jaccard, pelo método UPGMA. A avaliação da estabilidade dos agrupamentos dos dendrogramas foi realizada baseada em estimativas de dissimilaridade genética através do procedimento de reamostragens com 1000 bootstraps. Os valores superiores a 70% nos nós que unem os grupos indicam que as distâncias genéticas entre as unidades biológicas de um mesmo grupo são estáveis. O Software NTSYS-pc (ROHLF, 1992) foi utilizado para se obter as coordenadas principais e o gráfico de dispersão.

Para confirmar a confiabilidade dos grupos obtidos nas análises de agrupamento e de coordenadas principais (PCoA), utilizou-se a análise bayesiana utilizando o software Structure (PRITCHARD et al., 2000; PRITCHARD; DONNELLY, 2001; FALUSH et al., 2007), a qual não informa previamente quais os possíveis grupos de acordo com a origem dos acessos. O software Structure foi rodado usando o modelo 'admixture' de mistura, 'frequências alélicas correlacionadas' e repetido dez vezes para cada K (número de agrupamentos assumidos) com um *burn-in* de 500,000 interações seguido de 500,000 interações de MCMC (Markov Chain Monte Carlo). O número mais provável de grupos (populações) ou do valor de K foi determinado pelo método ΔK (EVANNO et al., 2005).

Com o intuito de identificar a proporção de variação genética existente entre e dentro dos grupos obtidos por meio do software Structure, os quais coincidiram com os grupos da PCoA e das análises de agrupamento, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) com base no Software Arlequin (SCHNEIDER et al., 2000). Outro parâmetro analisado foi a correlação entre matrizes de distâncias genética e geográfica, bem como entre as matrizes de distância genética dos marcadores SSR e ISSR, pela correlação de Pearson (r), cuja significância foi avaliada pelo teste de Mantel (1967), utilizando o Software NTSYS-pc (ROHLF, 1992).

6.3 Resultados

Foram selecionados oito *primers* de SSR e 16 de ISSR (Tabelas 6 e 7). Foram consideradas 56 bandas ou produtos de amplificação com tamanho variando de 101pb a 205pb para SSR e 137 bandas variando de 100pb a 1300pb para ISSR, em um total de 193 bandas com média de 7,0 bandas/loco para SSR e 8,56 bandas/loco para ISSR. O número de bandas polimórficas foi 54 e 100 com média de 6,75 e 6,25 bandas polimórficas por loco para SSR e ISSR, respectivamente. O nível de polimorfismo foi alto, 95% para SSR e 75,8% para ISSR. O valor médio do parâmetro D para SSR foi de 0,79, enquanto que para ISSR foi de 0,44, demonstrando que, embora o marcador ISSR tenha gerado um maior número de bandas, o marcador SSR apresentou maior poder de discriminação entre os acessos.

O coeficiente de similaridade de Jaccard entre os 53 acessos de *D. trifida* variou de 0,40 a 0,96, com uma variação de 56% de similaridade para SSR, e de 0,66 a 0,97, com uma variação de 31%, para ISSR. Embora os dois tipos de marcadores estejam localizados em regiões neutras e relacionados a diferentes sequências do genoma, a correlação entre as matrizes genéticas obtidas

a partir dos marcadores SSR e ISSR foi alta ($r = 0,57$ e $p = 0,0002$), demonstrando relação similar entre os dados de ambas as classes de marcadores.

Embora os marcadores SSR e ISSR tenham gerado dendrogramas com diferentes topologias (Figuras 7 e 8), de modo geral, ambos apresentaram a formação dos mesmos grupos, com poucas exceções. Apesar dos bootstraps terem sido baixos, com valores inferiores a 60% e deste modo não apresentados no dendrograma, foi possível identificar três grupos bem definidos: grupo I (acessos provenientes de Ubatuba-SP); grupo II (acessos provenientes de Iguape-SP e Santa Catarina-SC); e grupo III (acessos provenientes do Mato Grosso-MT). As variedades de inhame coletadas em Iguape-SP e Santa Catarina apresentaram maior similaridade genética, sendo que as variedades provenientes de Ubatuba-SP e Mato Grosso, classificadas em grupos distintos, apresentaram-se mais divergentes. Todos os acessos foram agrupados de acordo com seus locais de coleta para os dois marcadores, exceto os acessos da Amazônia, que mudaram sua posição no dendrograma em função do marcador molecular utilizado. Estes dois acessos foram classificados em um grupo separado (grupo IV) na análise com ISSR, enquanto que com SSR estes foram classificados no grupo II. Também, dentro do grupo II, os acessos de Santa Catarina foram melhor separados daqueles de Iguape-SP considerando as análises com SSR quando comparada com as análises realizadas com ISSR. O gráfico de dispersão obtido com SSR (Figura 9), cujas duas primeiras coordenadas principais representam 35,7% do total de variação existente entre os acessos analisados, separou os genótipos nos mesmos grupos obtidos no gráfico de dispersão de ISSR (Figura 10), cujas duas primeiras coordenadas principais representam 31,6% da variação total observada. Assim, ambos marcadores são úteis na discriminação e na aferição da diversidade genética dos acessos de *D. trifida*.

Tabela 6 - *Primers* de SSR utilizados para avaliar 53 acessos de *Dioscorea trifida* L., incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_A), variação do tamanho das bandas de SSR em pares de base (pb), número de bandas (N_B), número de bandas polimórficas (N_{BP}), porcentagem de polimorfismo (P) e poder de discriminação (D)

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	T_A (°C)	<i>Tamanho(pb)</i>	N_B	N_{BP}	P (%)	D
Da1A01 ¹	F: TAT AAT CGG CCA GAG G R: TGT TGG AAG CAT AGA GAA	51-53	202-205	2	2	100,0	0,97
Dab2C05 ¹	F: CCC ATG CTT GTA GTT GT R: TGC TCA CCT CTT TAC TTG	51-52	168-192	5	5	100,0	0,91
MTI2 ²	F: TCATCAAGAGCATCAAAAAAC R: GCCTCGTCTTTGAAGTTGGT	50-52	121-131	6	6	100,0	0,71
MTI3 ²	F: TAACAAACAAAAAATGAAAC R: TAACAGTGATTGAGCTAGGA	55-59	156-205	13	13	100,0	0,85
MTI4 ²	F: ACTTGGTGTTGTTGGATTGC R: TATCACTCCCCAGACCAGA	50-58	101-111	8	8	100,0	0,61
MTI10 ²	F: TCGTGTCCATCTTGCTGCGT R: GAAAAGCGGAGATGAAGAGCA	55-58	143-198	11	11	100,0	0,61
MTI11 ²	F: CTCTTTTGCTTCTCATTTC R: ATGTAGCCAATCCAAAATAG	55-56	124-137	5	4	80,0	0,72
MTI12 ²	F: CTGCCAGCGTTCCGATTC R: CGTAGGACCTCTCGCATCAG	55-60	100-123	6	5	83,0	0,92
Média		-	-	7,0	6,75	95,0	0,79

¹ Tostain et al. (2006); ² Hochu et al. (2006)

Tabela 7 - *Primers* de ISSR utilizados para avaliar 53 acessos de *Dioscorea trifida* L., incluindo suas respectivas sequências (5'-3'), temperatura de anelamento (T_A), variação do tamanho das bandas de SSR em pares de base (pb), número de bandas (N_B), número de bandas polimórficas (N_{BP}), porcentagem de polimorfismo (P) e poder de discriminação (D)

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	T_A (°C)	<i>Tamanho(pb)</i>	N_B	N_{BP}	P (%)	D
UBC 7	(CT)8-RG	48	300-1300	13	11	84,6	0,37
UBC 814	(CT)8-TG	50	500-1100	8	6	75,0	0,76
UBC 843	(CT)8-RA	48	600-1200	6	6	100,0	0,82
UBC 844	(CT)8-RC	50	300-1300	9	2	22,2	-0,35
UBC 898	(CA)6-RY	48	300-1300	12	6	50,0	-0,48
UBC 899	(CA)6-RG	54	300-1300	9	7	77,8	0,63
JOHN	(AG)7-YC	54	100-1200	13	9	69,2	0,81
UBC 901	(GT)6-YR	50	300-1300	8	8	100,0	0,67
UBC 902	(GT)6-AY	50	500-900	4	4	100,0	0,77
AW3	(GT)6-RG	54	500-800	4	3	75,0	0,75
OMAR	(GAG)4-RC	50	300-900	8	8	100,0	0,54
DAT	(GA)7-RG	54	300-800	9	2	22,2	-0,16
TERRY	(GTG)4-RC	50	300-800	9	5	55,6	0,49
MAO	(CTC)4-RC	50	400-1300	8	8	100,0	0,36
MANNY	(CAC)4-RC	48	300-1000	11	9	81,8	0,48
GOOFY	(GT)7-YG	54	300-900	6	6	100,0	0,56
Média	-	-	-	8,56	6,25	75,8	0,44

Figura 7 - Dendrograma obtido a partir dos dados de SSR demonstrando a relação genética entre 53 acessos de *D. trifida* L.: grupo I [acessos de Ubatuba-SP (verde)]; grupo II [acessos de Iguape-SP (azul), Santa Catarina (rosa) e Amazonas (amarelo)]; e grupo III [acessos do Mato Grosso (vermelho)]

Figura 8 - Dendrograma obtido a partir dos dados de ISSR demonstrando a relação genética entre 53 acessos de *D. trifida* L.: grupo I [acessos de Ubatuba-SP (verde)]; grupo II [acessos de Iguape-SP (azul) e Santa Catarina (rosa)]; grupo III [acessos do Mato Grosso (vermelho)] e grupo IV [acessos do Amazonas (amarelo)]

Figura 9 - Gráfico de dispersão das duas primeiras coordenadas principais responsáveis por 35,67% da variação total entre 53 acessos de *Dioscorea trifida* L. avaliados por marcadores SSR, demonstrando a formação de três grupos principais: grupo I (acessos provenientes de Ubatuba-SP); grupo II (acessos provenientes de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas); e grupo III (acessos provenientes do Mato Grosso)

Figura 10 - Gráfico de dispersão das duas primeiras coordenadas principais responsáveis por 31,65% da variação total entre 53 acessos de *Dioscorea trifida* L. avaliados por marcadores ISSR, demonstrando a formação de três grupos principais: grupo I (acessos provenientes de Ubatuba-SP); grupo II (acessos provenientes de Iguape-SP e Santa Catarina); grupo III (acessos provenientes do Mato Grosso); e grupo IV (acessos provenientes do Amazonas)

A análise Bayesiana realizada a partir do software Structure para os dados de SSR e ISSR confirmou os grupos obtidos nas análises de agrupamentos e PCoA, dado o valor de k igual a três, demonstrando que os acessos estão geneticamente estruturados em três grupos (Figuras 11 e 12). Com base nos dados de SSR, os dois acessos do Amazonas apresentaram mais de 90% de sua constituição genética similar aos acessos de Iguape-SP e Santa Catarina (Figura 11), enquanto que a partir dos dados de ISSR, os mesmos acessos apresentaram mais de 60% de similaridade com os acessos de Mato Grosso e mais de 30% com os de Ubatuba-SP (Figura 12). Comparando ambas as análises, o marcador SSR apresentou algumas exceções aos grupos formados no dendrograma (Figura 7), tais como os acessos 17 e 18, provenientes de Ubatuba-SP, apresentando mais de 50% de similaridade aos acessos de Iguape-SP e Santa Catarina, enquanto que o acesso 40, do Mato Grosso, apresentou mais de 80% de similaridade aos acessos de Iguape e Santa Catarina (Figura 11). O gráfico obtido a partir do marcador ISSR (Figura 12), por outro lado, apresentou um grupo padrão com grande similaridade ao dendrograma com ISSR (Figura 8).

A partir da análise de variância considerando os três grupos formados na análise Bayesiana e dois níveis de comparação, entre e dentro de grupos, diferenças foram encontradas entre os materiais genéticos estudados tanto para os dados obtidos a partir de SSR ($\Phi_{st} = 0,39$; $p = 0,0000$) como para ISSR ($\Phi_{st} = 0,33$; $p = 0,0000$) (Tabela 8). A variação genética foi maior dentro do que entre grupos tanto para SSR (60,6%) como ISSR (66,5%). Uma baixa correlação positiva foi identificada entre as distâncias genéticas e geográficas tanto para SSR ($r = 0,08$; $p = 0,0007$) como para ISSR ($r = 0,16$; $p = 0,0002$), demonstrando que os materiais genéticos estão levemente estruturados nas áreas geográficas amostradas.

O índice de diversidade de Shannon obtido a partir dos dados de SSR indicaram que o Estado de São Paulo apresentou maior diversidade genética (0,40), seguido do Mato Grosso (0,31) e Santa Catarina (0,27) (Tabela 9). Resultados similares foram obtidos para os dados de ISSR, mas com valores mais baixos (0,28, 0,21 e 0,19, respectivamente). O Estado do Amazonas obteve os menores índices de diversidade (0,09 para SSR and 0,03 para ISSR), devido ao baixo número de acessos amostrados. Considerando os grupos formados na análise e análises de agrupamento com SSR, o grupo II (acessos de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas) obteve o maior índice de diversidade (0,40), seguido do grupo III (0,31) (acessos do Mato Grosso) e grupo I (0,30) (acessos de Ubatuba-SP) para SSR, enquanto valores mais baixos e similares foram obtidos para os três grupos a partir dos dados de ISSR.

Figura 11 - Estrutura da diversidade genética de 53 acessos de *Dioscorea trifida* com base na análise Bayesiana para oito marcadores SSR. Cada acesso está representado por uma barra vertical. Os acessos de 1 a 20 são provenientes de Ubatuba-SP; acessos de 21 a 39 são provenientes de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas; e os acessos de 40 a 53 são provenientes do from Mato Grosso

Figura 12 - Estrutura da diversidade genética de 53 acessos de *Dioscorea trifida* com base na análise Bayesiana para 16 marcadores ISSR. Cada acesso está representado por uma barra vertical. Os acessos de 1 a 20 são provenientes de Ubatuba-SP; acessos de 21 a 39 são provenientes de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas; e os acessos de 40 a 53 são provenientes do from Mato Grosso

Tabela 8 - Análise de variância molecular (AMOVA) para 53 acessos de *Dioscorea trifida* L. considerando três grupos, de acordo com a análise bayesiana com o software Structure: grupo I (acessos de Ubatuba-SP), grupo II (acessos de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas), e grupo III (acessos de Mato Grosso)

Fonte de variação	GL	SSR		ISSR	
		SQ	Variação total (%)	SQ	Variação total (%)
Entre grupos	3	150,295	39,37	221,218	33,53
Dentro de grupo	49	288,346	60,63	528,404	66,47
Total	52	438,642			

*Valor p^j (1023 permutações) = 0,0000

Φ_{st} = 0,3937 para SSR e Φ_{st} = 0,3353 para ISSR; GL - Grau de liberdade; SQ - Soma dos quadrados

Tabela 9 - Índice de diversidade de Shannon (H') dos acessos de *Dioscorea trifida* por Estado e de acordo com os grupos formados a partir da análise Bayesiana com o software Structure: grupo I (acessos de Ubatuba-SP), grupo II (acessos de Iguape-SP, Santa Catarina e Amazonas), e grupo III (acessos do Mato Grosso)

Estados	H'	
	SSR	ISSR
São Paulo	0,40	0,28
Mato Grosso	0,31	0,21
Santa Catarina	0,27	0,19
Amazonas	0,09	0,03
Média	0,27	0,18
Grupo		
Grupo I	0,30	0,21
Grupo II	0,40	0,20
Grupo III	0,31	0,22
Média	0,34	0,21

6.4 Discussão

6.4.1 Diversidade genética e análise comparativa entre os marcadores SSR e ISSR

A grande quantidade de marcadores moleculares disponíveis para estimar a diversidade genética nos permite fazer comparações, a fim de determinar qual técnica é mais adequada para uma determinada cultura (BISWAS et al., 2010). A escolha da técnica mais apropriada depende do objetivo da pesquisa, modo de reprodução da espécie e sua estrutura genética (BADFAR-CHALESHTORI et al., 2012), e são normalmente baseadas em estimativas de heterozigosidade (POWELL et al., 1996). No entanto, dificuldades em relacionar padrões de fragmentos para locos e genótipos específicos em genomas de espécies poliplóides, como *D. trifida*, limita a utilização da estimativa de heterozigosidade para avaliar técnicas de marcadores nessas espécies (McGREGOR et al., 2000).

Os microssatélites são marcadores unilocos e codominantes, capazes de detectar indivíduos heterozigotos em espécies diplóides, entretanto em espécies poliplóides estes marcadores não são capazes de fornecer tal informação de forma precisa (PFEIFFER et al., 2011). Como *D. trifida*, além de ser poliplóide, apresenta controvérsias em relação ao seu nível de ploidia (BOUSALEM

et al., 2006), optou-se neste trabalho por analisar os marcadores SSR como dados binários (presença e ausência de fragmentos de DNA), da mesma maneira que se procede ao analisar marcadores dominantes, tais como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), bem como os ISSR. Portanto, mesmo restringindo as análises dos dados gerados a partir do polimorfismo de microssatélite existente entre os acessos, estes foram capazes de fornecer informações consistentes sobre a variabilidade genética existente nesses materiais.

Muitas técnicas de marcadores moleculares dominantes podem ser utilizadas para analisar a diversidade genética de *Dioscorea* spp. (ZHOU et al., 2007). Dentre os marcadores dominantes, o ISSR consiste numa técnica bastante estável e geram um grande número de fragmentos polimórficos e discriminantes (MATTIONI et al., 2002). Apesar de ser considerada uma técnica restrita, principalmente devido ao alto grau de homoplasia ocasionado pela ocorrência de fragmentos comigrantes (BUSSELL et al., 2005), a técnica de ISSR apresenta um custo relativamente baixo, quando comparada a outras técnicas (YANG et al., 1996), e mais simples de usar do que a técnica de SSR (REDDY et al., 2002), não sendo necessária nenhuma informação prévia genômica para a sua aplicação (BORNET; BRANCHARD, 2001). Assim, este marcador é capaz de identificar uma grande variação genética intra e interespecífica, sendo cada vez mais utilizado em estudos de caracterização, identificação e estimação da diversidade genética de bancos de germoplasmas. Considerando as vantagens dessa técnica, os marcadores de ISSR também foram utilizados para estimar a diversidade genética de *D. trifida* neste trabalho, sendo o único estudo desenvolvido até então com este marcador molecular para esta espécie de inhame.

Neste estudo, observou-se que é possível utilizar tanto a técnica de SSR como ISSR para caracterizar e discriminar acessos de inhame morfológicamente distintos ou similares. Também, os resultados obtidos a partir dos marcadores SSR e ISSR destacam a importância dos agricultores tradicionais na manutenção da alta diversidade genética entre suas variedades locais. Os oito locos SSR analisados mostraram-se altamente polimórficos e informativos entre os 53 acessos de *D. trifida* analisados neste estudo. Os *primers* heterólogos Da1A01 e Dab2C05, desenvolvidos por Tostain et al. (2006) para as espécies *D. alata*, *D. abyssinica* e *D. praehensilis*, apresentaram 100% de polimorfismo, bem como alto poder de discriminação dos acessos estudados, com o parâmetro *D* igual a 0,97 e 0,91, respectivamente. Estes *primers* também se mostraram eficientes para a análise da diversidade genética dos acessos de *D. trifida* avaliados

em testes de transferibilidade realizados por Tostain et al. (2006). Os *primers* específicos para *D. trifida*, desenvolvidos por Hochu et al. (2006), além de apresentarem bandas definidas no gel, mostraram alto polimorfismo, com média de 93,8%, e elevado número de bandas por loco (7 bandas em média), destacando-se os *primers* MTI3 e MTI10 que revelaram 13 e 11 bandas, respectivamente (Tabela 6). Por outro lado, foram observadas apenas cinco bandas reveladas pelo *primer* MTI11, semelhante aos resultados obtidos por Hochu et al. (2006), onde também obtiveram poucas bandas, duas aproximadamente, para este *primer*.

Com exceção dos *primers* UBC 844, UBC 898 e DAT, que apresentaram baixo polimorfismo e baixo poder de discriminação entre os acessos analisados, todos os outros locos ISSR analisados mostraram-se altamente polimórficos e com elevado número de bandas por locos, destacando-se os *primers* UBC 7, UBC 898, JOHN e MANNY. Estes locos revelaram mais de dez bandas (Tabela 7), bem como alto poder de discriminação entre os acessos estudados, com o parâmetro *D* variando de 0,36 a 0,82. A alta porcentagem de polimorfismo (75,8%, em média) observada para os ISSR também foi encontrada por Zhou et al. (2008), ao analisar 28 cultivares de *D. opposita* com base em sete *primers* de ISSR, onde obtiveram um total de 65 fragmentos com 83% de polimorfismo. Elevados níveis de polimorfismo parecem ser comuns em ISSR, pois análises realizadas em outras culturas também detectaram resultados semelhantes, tais como em batata, com 90% de polimorfismo (PREVOST; WILKINSON, 1999) e batata-doce, com 62,2% (HUANG; SUN, 2000).

Os resultados do teste de Mantel revelaram que os dados obtidos com os marcadores SSR e ISSR estão correlacionados ($r = 0,57$; $p = 0,0002$), apesar de representarem diferentes sequências genômicas. Diversos estudos têm observado a existência de alta correlação entre diferentes técnicas de marcadores moleculares em várias espécies (BELAJ et al., 2003; BISWAS et al., 2010). Na maioria dos estudos realizados em espécies autógamas foram reportadas correlação significativa entre dois ou mais marcadores, provavelmente devido aos genótipos serem homozigóticos. Entretanto, *D. trifida* por ser uma espécie dióica e propagada vegetativamente por tubérculos, apresenta indivíduos bastante homogêneos e com uma base genética limitada. Com esta homogeneidade, um alto nível de similaridade entre os diferentes marcadores pode ser esperado (BADFAR-CHALESHTORI et al., 2012).

6.4.2 Estrutura genética e desenvolvimento de estratégias de conservação

No Brasil, centro de diversidade e domesticação de várias espécies, os estudos de diversidade genética são, na maioria das vezes, associados a culturas de grande importância econômica (CLEMENT et al., 2010), e cultivos de raízes e tubérculos, como inhame têm sido negligenciados pela pesquisa, tanto para melhoramento como para conservação (SIQUEIRA, 2011b). Neste contexto, o inhame é considerado uma cultura subutilizada, submetida principalmente à seleção de caracteres interessantes para as comunidades tradicionais, onde cada agricultor mantém as variedades de sua preferência, ocorrendo assim baixo nível de comercialização e intercâmbio desses materiais, quando comparados a outras culturas, como a mandioca, batata e batata-doce (SIQUEIRA et al., 2011a). Com isto, *D. trifida* pode ser afetada pelo processo de deriva genética, cujo efeito é intensificado devido à presença de dioicia, sendo necessária uma planta masculina e uma feminina no mesmo local para ocorrer a recombinação genética entre os indivíduos (MIGNOUNA et al., 2003). Apesar desta espécie ser alógama em condições edafoclimáticas favoráveis, ela é intensamente mantida por propagação vegetativa nos campos de cultivo, sendo que na maioria das vezes, os clones dos mesmos indivíduos são coletados e plantados durante alguns anos. Entretanto, os acessos analisados neste estudo ainda apresentam elevada variabilidade genética, com uma variação no coeficiente de similaridade de Jaccard igual a 31% e 56% para SSR e ISSR, respectivamente. Veasey et al. (2012), ao analisarem acessos da mesma espécie coletados no Vale do Ribeira, São Paulo, com base em marcadores isoenzimáticos, observaram uma variação no coeficiente de similaridade de Jaccard igual a 83%.

Nas análises de agrupamento, baseadas no coeficiente de Jaccard e no método UPGMA, assim como nas análises de coordenadas principais e Bayesiana foi possível identificar três grupos geneticamente distintos. Um dos três grupos mencionados acima consistiu dos acessos de Iguape no litoral sul do Estado de São Paulo, que foi agrupado com acessos coletados no litoral norte de Santa Catarina, nas cidades de Joinville e São Francisco do Sul. Um segundo grupo foi formado pelos acessos do litoral norte de São Paulo, em Ubatuba, e um terceiro grupo composto pelos acessos coletados em Mato Grosso, uma região bem distante das outras. A exceção foi para os acessos da Amazônia, comercializados em feiras livres locais do Estado do Amazonas, que dependendo do tipo de marcador ou região genômica amostrada, mudaram de posição no dendrograma.

Um fato interessante neste estudo foi a separação dos acessos provenientes do litoral norte e sul de São Paulo. No Vale do Ribeira, no litoral sul de São Paulo, Veasey et al. (2012) observaram a estrutura espacial da variação genética dentro de uma escala menor com marcadores isoenzimáticos. As variedades locais do Vale do Ribeira foram agrupadas de acordo com seus municípios. Dois grupos (com 100% de *bootstrap*) foram obtidos na análise de agrupamento, um com variedades de Iguape e outro com variedades de Cananéia. A mesma estrutura genética foi observada no presente estudo, mas numa escala geográfica maior, separando os acessos entre as áreas do litoral norte e sul do Estado de São Paulo. A explicação para este fato seja talvez a introdução dos acessos desta espécie por ondas de migrantes de diferentes regiões ou ainda de diferentes grupos étnicos. Por outro lado, houve uma maior similaridade dos acessos do litoral sul de São Paulo, Iguape, com aqueles de Santa Catarina, sugerindo que os acessos destas duas regiões adjacentes geograficamente tenham a mesma origem.

Essa dinâmica também pode estar relacionada com a influência indígena sobre a domesticação da espécie *D. trifida*, que vem sendo cultivada por índios desde as áreas costeiras à região Centro-Oeste do Brasil (PEDRALI, 1998). Dentre os grupos indígenas envolvidos neste processo, destacam-se os guaranis, caracterizados por serem itinerantes e bastante dispersos pelo território brasileiro, incluindo o litoral do Estado de São Paulo (LADEIRA, 2007). Estes grupos étnicos se dispersavam por longas distâncias carregando consigo várias espécies de plantas comestíveis, dentre as quais incluía *D. trifida* (SCHMITZ; GAZANNEO, 1991). Esta espécie é fortemente associada a estes povos, que também possuem grande influência sobre as populações tradicionais do Vale do Ribeira, São Paulo (VEASEY et al., 2012), onde se localiza o município de Iguape.

A manutenção da variação genética é um dos principais objetivos das estratégias de conservação (HAMRICK; GODT, 1996) e o conhecimento da variação entre e dentro de populações fornece informações essenciais na formulação de estratégias apropriadas (FRANCISCO-ORTEGA et al., 2000). Neste estudo, a maior parte da variabilidade genética foi observada dentro de grupos (60,6% e 66,5% para SSR e ISSR, respectivamente), mas mesmo entre grupos a variabilidade genética foi elevada (39,4% e 33,5% para SSR e ISSR, respectivamente). Veasey et al. (2012), comparando dois grupos de acessos de *D. trifida* analisados com oito locos SSR, um grupo composto por sete acessos dos municípios de Iguape e

Cananéia, em São Paulo e um de Mato Grosso, e outro grupo com quatro acessos da Amazônia, observaram a maior parte da variação entre grupos (62,9%), quando comparada com a variação dentro de grupos (37,1%). Este resultado demonstrou que os acessos da Amazônia foram geneticamente diferentes dos outros acessos.

No presente estudo, observou-se grande diferença genética entre os acessos provenientes das diferentes localidades analisadas, ou seja, entre grupos, dado o valor Φ_{st} igual a 0,3937 para SSR e 0,3353 para ISSR, o que corresponde a um baixo fluxo gênico entre as regiões estudadas. Este padrão demonstra que, de modo diferente de outras espécies cultivadas na agricultura tradicional, tais como mandioca (SIQUEIRA et al., 2009) e batata doce (VEASEY et al., 2008), *D. trifida* é uma cultura mais regionalizada ou menos abrangente quando comparada a outras espécies de inhame, tais como *D. alata* (BREISSAN et al., 2011; SIQUEIRA, 2011b). Esta observação pode estar relacionada a fatores históricos e socioeconômicos, tais como modo de utilização e variação na preferência de variedades ao longo do tempo e do espaço (VEASEY et al., 2010). A existência de correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas obtida no teste de Mantel, confirma a estruturação desses materiais no espaço geográfico amostrado.

Embora o valor desta correlação não tenha sido muito elevado, o fato de ser significativo ao nível de 1% confirma a estruturação espacial da variação genética, que é condizente com o valor de Φ_{st} observado. Entretanto, o baixo valor da correlação pode ser devido à existência de possíveis trocas recentes de materiais entre essas regiões, realizadas por organizações não governamentais que trabalham junto aos grupos indígenas, a fim de incentivar o intercâmbio de genótipos e inserir novos materiais para evitar a deriva genética dessas variedades. Assim, são realizadas feiras de intercâmbio, possibilitando então a obtenção e o fornecimento de novos genótipos.

Existem poucas informações sobre estes grupos indígenas, que assim como muitas tribos têm sobrevivido a diversas pressões, tais como lutas fundiárias, além das pressões socioculturais das sociedades modernas (ARRUDA, 1999). Estas dificuldades são comuns tanto para grupos indígenas como para agricultores, que cultivam diversas espécies de forma tradicional nas regiões tropicais.

Considerando que há diferença genética entre os materiais cultivados nos locais estudados, observou-se que os acessos de São Paulo apresentaram maior diversidade, seguidos dos acessos de Mato Grosso, Santa Catarina e Amazonas. Considerando os grupos formados na análise

Bayesiana, a maior diversidade genética encontrada foi entre os acessos do grupo II para SSR, que inclui acessos de três Estados (São Paulo, Santa Catarina e Amazonas). Enquanto, para ISSR, a maior diversidade foi encontrada no grupo III (Acessos do Mato Grosso), embora os valores tenham sido bastante similares entre os três grupos. Em geral, o nível médio de diversidade genética foi de 0,34 e 0,21 para SSR e ISSR, respectivamente. Estes índices são maiores do que os valores encontrados para ervas perenes ($H' = 0,17$) e espécies com ampla distribuição geográfica ($H' = 0,20$) (HAMRICK; GODT, 1989). Entretanto, estudos realizados por Zhou et al. (2008) em cultivares de inhame da espécie *D. opposita*, bastante utilizada na medicina chinesa, demonstraram $H' = 0,32$, valor relativamente alto e superior ao obtido para *D. trifida* neste estudo. Vale ressaltar que diversos fatores influenciam o nível de diversidade genética de uma espécie, dentre esses, a distribuição geográfica, ciclo de vida, sistema reprodutivo, padrão de dispersão, tamanho efetivo populacional, entre outros (HAMRICK et al., 1991; GAUDEUL et al., 2000; ZHOU et al., 2008).

Esse nível de diversidade genética observada entre os acessos está diretamente relacionada ao fato de *D. trifida* ser uma espécie poliplóide e se reproduzir simultaneamente por alogamia e propagação vegetativa. Assim, os indivíduos são em geral altamente heterozigóticos, preservando a diversidade alélica ao nível de indivíduo (VEASEY et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2009; McKEY et al., 2010). Entretanto, o surgimento de plantas variantes decorrentes de sementes, resultado de recombinação genética, é pouco provável, uma vez que não foi relatada e detectada a ocorrência de florescimento e frutificação na espécie pelos agricultores durante a coleta.

O nível de diversidade genética apresentada pelos acessos coletados nos Estados de São Paulo, Mato Grosso e Santa Catarina já era esperado, devido à grande abrangência da cultura nessas regiões. No entanto, a obtenção de variedades geneticamente mais próximas pode estar relacionada com o fato da coleta ter sido restrita a poucos agricultores e poucas comunidades em Ubatuba, em São Paulo, onde a coleta foi realizada na comunidade do Sertão de Ubatumirim e na comunidade de Pirabeiraba, em Santa Catarina. A similaridade entre os acessos corroboram com as denominações dadas pelos agricultores nas regiões estudadas. Em Ubatuba, São Paulo, exceto o acesso 195, denominado “cará cobrinha”, foram obtidas variedades com apenas duas denominações populares, “cará roxo” e “cará branco”, sendo o último representado em menor número. Em Iguape, São Paulo, apenas três denominações foram observadas para a espécie, “cará são João branco”, “cará são João roxo” e “cará-pipa”. Em Mato Grosso, a maioria dos acessos

também recebeu a denominação “cará roxo”. Já em Santa Catarina, as denominações predominantes para a espécie *D. trifida* foram “cará” e “cará mimoso”.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que ambos marcadores foram úteis para avaliar a diversidade genética e diferenciar os acessos de *D. trifida* no Brasil. Entretanto, o marcador SSR detectou maiores índices de diversidade, enquanto que o marcador ISSR pareceu ser mais eficiente no agrupamento de diferentes genótipos, sendo capaz de separar os dois acessos do Amazonas. Ambos marcadores detectaram altos níveis de diversidade genética para os acessos de *D. trifida* mantidos pelos agricultores tradicionais dos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Santa Catarina e Amazonas. Alto nível de diversidade genética foi encontrado entre os acessos de *D. trifida* coletados nos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Santa Catarina e Amazonas, a qual vem sendo mantida pelos agricultores tradicionais. A alta diversidade intrapopulacional encontrada é bastante interessante para a sua viabilidade ao longo do tempo. O conhecimento da similaridade genética dos acessos e sua relação genética constituem informações importantes para a utilização e conservação eficiente dessa espécie, tanto *ex situ*, em bancos de germoplasma, como *in situ*, dentro da visão de conservação *in situ* na propriedade rural, conhecida como conservação *on farm*. Como foram encontradas diferenças genéticas entre e dentro dos grupos de acessos provenientes das diferentes regiões visitadas, as estratégias de coleta e conservação devem amostrar um grande número de indivíduos de todas as regiões amostradas, a fim de abranger toda a diversidade genética presente nesses materiais. A conservação *on farm*, no caso de *D. trifida*, é bastante interessante por considerar o meio sociocultural envolvido com os fatores evolutivos da espécie, pois sabe-se que as práticas agrícolas, através do cultivo e da seleção artificial, permitiram acumular ao longo do tempo caracteres morfológicos agrônômicos interessantes, propiciando um enriquecimento da variabilidade genética não apenas desta espécie, mas de outras plantas cultivadas.

Referências

ARRUDA, R. “Populações tradicionais” e a proteção dos recursos naturais em unidades de conservação. **Ambiente & Sociedade**, Campinas, v. 5, p.79-252, 1999.

AYENSU, E.S.; COURSEY, D.G. Guinea yams: the botany, ethnobotany, use and possible future of yams in West Africa. **Economic Botany**, New York, v. 26, p. 301-318, 1972.

BADFAR-CHALESHTORI, S.; SHIRAN, B.; KOHGARD, M.; MOMMENI, H.; HAFIZI, A.; KHODAMBASHI, M.; MIRAKHORLI, N.; SORKHEH, K. Assessment of genetic diversity and structure of Imperial Crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 42, p. 35-48, 2012.

BELAJ, A.; SATOVIC Z.; CIPRIANI, G.; BALDONI, L.; TESTOLIN, R.; RALLO, L.; TRUJILLO, I. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 736-744, 2003.

BISWAS, M.K.; XU, Q.; DENG, X. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, p. 254-261, 2010.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat ISSR markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 19, p. 209-215, 2001.

BOUSALEM, M.; AMAU, G.; HOCHU, I.; AMOLIN, R.; VIADER, V.; SANTONI, S.; DAVID, J. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the *Dioscorea*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, p. 439-451, 2006.

BOUSALEM, M.; VIADER, V.; MARIAC, C.; GOMEZ, R.; HOCHU, I.; SANTONI, S.; DAVID, J. Evidence of diploidy in the wild Amerindian yam, a putative progenitor of the endangered species *Dioscorea trifida* (Dioscoreaceae). **Genome**, Ottawa, v. 53, p. 371-383, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Agrobiodiversidade e diversidade cultural**. 2006. Disponível em:
<http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_agrobio/_publicacao/89_publicacao21092009104952>.
Acesso em: 10 mar. 2012.

BRESSAN, E.A.; BRINER NETO, T.; ZUCCHI, M.I.; RABELLO, R.J.; VEASEY, E.A. Morphological variation and isozyme diversity in *Dioscorea alata* L. landraces from Vale do Ribeira, Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, p. 494-502, 2011.

BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A.; PERONI, N.; FELIPIM, A.P.; SANTOS, K.M.P. Collecting yam (*Dioscorea* spp.) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm in traditional agriculture small-holdings in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 144, p. 8-13, 2005.

BURKILL, I.H. The organography and the evolution of the Dioscoreaceae, the family of the yams. **The Journal of the Linnean Society Botany**, London, v. 56, p. 319-412, 1960.

BUSSELL, J.D.; WAYCOTT, M.; CHAPPIL, J.A. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zurich, v. 7, p. 3-26, 2005.

CLEMENT, C.R. 1942 and the loss of Amazonian crop genetic resources. II. Crop biogeography at contact. **Economic Botany**, New York, v. 53, p. 203-216, 1999.

CLEMENT, C.R.; CRISTO-ARAÚJO, M.; D'EECKENBRUGGE, G.C.; ALVES-PEREIRA, A.; PICANÇO-RODRIGUES, D. Origin and domestication of native Amazonian crops. **Diversity**, Basel, v. 2, p. 72-106, 2010.

COURSEY, D.G. The origin and domestication of yams in Africa. In: HARLAN, J.R.; DE WET, J.M.J.; STEMLER MOUTON, A.B.L. **Origin of African plant domestication**. Dordrecht: Mouton Hague, 1976. p. 383-408.

CRESTE, S.; TULMANN, N. A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 19, p. 299-306, 2001.

DEGRAS, L. **The yam: a tropical root crop**. London: The Macmillan, 1993. 408 p.

DICKAU, R.; RANERE, A.J.; COOKE, R.G. Starch grain evidence for the preceramic dispersals of maize and root crops into tropical dry and humid forests of Panama. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 104, p. 3651-3656, 2007.

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

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.7, p. 574-578, 2007.

FRANCISCO-ORTEGA, J.; SANTOS-GUERRA, A.; KIM, S.C.; CRAWFORD, D.J. Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 87, p. 909-919, 2000.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species, In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1989. p. 43-46.

_____. Conservation genetics of endemic plant species, In: AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman and Hall, 1996. p. 281-304.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.; MURAWSKI, D.A.; LOVELESS, M.D. Correlations between species and allozyme diversity: implications for conservation biology, In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. **Genetics and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 75-86.

HOCHU, I.; SANTONI, S.; BOUSALEM, M. Isolation, characterization and cross-species amplification of microsatellite DNA loci in the tropical American yam *Dioscorea trifida*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 137-140, 2006.

HUANG, J.; SUN, M. Fluorescein PAGE analysis of microsatellite-primed PCR: a fast and efficient approach for genomic fingerprinting. **Biotechniques**, London, v. 28, p. 1069-1072, 2000.

KNUTH, R. Dioscoreaceae. **Pflanzenreich**, Ohio, v. 87, p. 1-278, 1924.

LADEIRA, M.I. **“O caminhar sob a luz”-o território Mbyá à beira do Oceano**. São Paulo: EDUNESP, 2007. 200 p.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids**. London: CABI, 2009. 413 p.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Resources**, London, v. 27, p. 202-209, 1967.

MATTIONI, C.; CASASOLI, M.; GONZALEZ, M. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean Nothofagus species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 1064-1070, 2002.

McKEY, D.; ELIAS, M.; PUJOL, B.; DUPUTIE, A. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 186, p. 318-332, 2010.

McGREGOR, C.E.; LAMBERT, C.A.; GREYLING, M.M.; LOUW, J.H.; WARNICH, L.A. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 113, p. 135-144, 2000.

MIGNOUNA, H.D.; ABANG, M.M.; FAGBEMI, S.A. A comparative assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for white yam (*Dioscorea rotundata*) germplasm characterization. **Annals of Applied Biology**, London, v. 142, p. 269-276, 2003.

MILBOURNE, D.; MEYER, R.; COLLINS, A.J.; RAMSAY, L.D.; GEBHARDT, C.; WAUGH, R. Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 259, p. 233-245, 1998.

MONTALDO, A. **Cultivo de raíces y tubérculos tropicales**. Lima: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, 1991. 407 p.

ODU, B.O.; ASIEDU, R.; HUGHES, J.D.A.; SHOYINKA, S.A.; OLADIRAN, O.A. Identification of resistance to yam mosaic virus (YMV), genus *Potyvirus* in white Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir). **Field Crops Resources**, Amsterdam, v. 89, p. 97-195, 2004.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 294-307, 2006.

OLSEN, K.M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 56, p. 517-526, 2004.

PEDRALLI, G. **Revisão taxonômica das espécies de *Dioscoreaceae* (R.Br.) Lindley da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil**. 1998. 400 p. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998.

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P. **DARwin software**. 2006. Disponível em: <<http://darwin.cirad.fr/darwin>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

PFEIFFER, T.; ROSCHANSKI, A.M.; PANNELL, J.R.; KORBECKA, G.; SCHNITTLER, M. Characterization of microsatellite loci and reliable genotyping in a polyploid plant, *Mercurialis perennis* (Euphorbiaceae). **Journal of Heredity**, Oxford, v. 102, p. 479-88, 2011.

PIPERNO, D.R.; RANERE, A.J.; HOLST, I.; HANSELL, P. Starch grains reveal early root crop horticulture in the Panamanian tropical forest. **Nature**, London, v. 407, p. 894-897, 2000.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, p. 223-225, 1996.

PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 107-112, 1999.

PRITCHARD, J.K.; DONNELLY, P. Case-control studies of association in structured or admixed populations. **Theoretical Population Biology**, Zurich, v. 60, p. 227-237, 2001.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Bethesda, v. 155, p. 945-959, 2000.

RAMOS-ESCUADERO, F.; SANTOS-BUELGA, C.; PÉREZ-ALONSO, J.J.; YÁÑES, J.A.; DUEÑAS, M.HPLC-DAD-ESI/MS identification of anthocyanins in *Dioscorea trifida* L, yam tuber (purple sachapapa). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, p. 745-752, 2010.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; REDDY, E.A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, p. 9-17, 2002.

ROGSTAD, S.H. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. **Taxon**, Mainz, v. 41, p. 701-708, 1992.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.70 (software). New York: Stony Brook, 1992. 83 p.

SCHMITZ, P.I.; GAZZANEI, M. O que comia o Guarani pré-colonial. **Revista de Arqueologia**, João Pessoa, v. 6, p. 89-105, 1991.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: software for population data analysis (Software). Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, 2000. 1 v.

SILVA, L.R.G.; BAJAY, M.M.; MONTEIRO, M.; MEZETTE, T.F.; PINHEIRO, J.B.; VEASEY, E.A. Isolation and characterization of microsatellites for an important tuber crop (*Dioscorea cayenensis*) and cross-amplification in *D. rotundata* (Dioscoreaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, 2013. No prelo.

SIQUEIRA, M.V.B.M. **Caracterização da diversidade genética de inhame (*Dioscorea alata*) utilizando marcadores microssatélites**. 2011. 165 p. Tese (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011b.

_____. Yam: aneglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 6-20, 2011a.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; BORGES, A.; VALLE, T.L.; VEASEY, E.A. A comparative genetic diversity assessment of industrial and household Brazilian cassava varieties using SSR markers. **Bragantia**, Campinas, v.70, n.4, p.745-752, 2011a.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; MARCONI, T.G.; BONATELLI, M.L.; ZUCCHI, M.I.; VEASEY, E.A. New microsatellite loci for water yam (*Dioscorea alata*, Dioscoreaceae) and cross-amplification for other *Dioscorea* species. **American Journal of Botany**, New York, v. 98, p. 144-146, 2011b.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; BORGES, A.; PEREIRA, K.J.C.; PINTO, J.G.; VEASEY, E.A. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 104-110, 2009.

STEPHENS, J.M. **Cushcush – *Dioscorea trifida* L.** Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/mv057>>. Acesso em: 27 dez. 2009.

TAMIRU, M.; BECKER, H.C.; MASS, B.L. Diversity, distribution and management of yam landraces (*Dioscorea* spp.) in Southern Ethiopia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 55, p. 115-131, 2008.

TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSIQUOT, J.; CHARRIER, A. Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 171-177, 1999.

TOSTAIN, S.; SCARCELLI, N.; BROTTIER, P.; MARCHAND, J.L.; PHAM, J.L.; NOYER, J.L. Development of DNA microsatellite markers in tropical yam (*Dioscorea* sp.). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 173-175, 2006.

VEASEY, E.A.; BORGES, A.; ROSA, M.S.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Genetic diversity in Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) landraces assessed with microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 725-733, 2008.

VEASEY, E.A.; BRESSAN, E.A.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; BORGES, A.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; PEREIRA, K.J.C.; RECCHIA, G.H.; MING, L.C. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and yam (*Dioscorea trifida* L.) landraces in swidden agriculture systems in Brazil. In: GEPTS, P.; FAMULA, T.R.; BETTINGER, R.L.; BRUSH, S.B.; DAMANIA, A.B.; MCGUIRE, P.E.; QUALSET, C.O. (Ed.). **Biodiversity in agriculture: domestication, evolution, and sustainability**. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. p. 344-360.

VEASEY, E.A.; SIQUEIRA, M.V.B. M.; SILVA, L.R.G.; NASCIMENTO, W.F.; FERREIRA, A.B.; SILVA, D.; SILVA, E.; MING, L.C.; PERONI, N.; SANTOS, A.H. Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas brasileiros. In: KFFURI, C.W.; AMOROZO, M.C.M.; MING, L.C. (Org.). **Agrobiodiversidade no Brasil: experiências e caminhos da pesquisa**. Recife: NUPEEA, 2010. p. 45-74

VELEZ, G.A. The chagra: collective patrimony of the indigenous amazonian communities. **Beyond Law**, Bogotá, v. 6, p. 121-142, 1998.

WOLFE, A.D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods in Enzimology**, Welwyn, v. 395, p. 134-144, 2005.

WOLFE, A.D. **ISSR protocols**. 2000. Disponível em: <<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/protocols.ISSR.html>>. Acesso em: 18 maio 2009.

WU, Z.; LENG, C.; TAO, Z.; WEI, Y.; JIANG, C. Genetic diversity of *Dioscorea alata* on ISSR analysis. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, Pei-Ching, v. 34, n. 23, p. 3017-3020, 2009.

YANG, W.; OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.; SCHERTZ, K.; BENNETZEN, J.L. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. **Crop Science**, Madison, v. 6, p. 1669-1676, 1996.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J.; YE, Z.H.; MAO, J.X. **POPGENE**: the user-friendly shareware for population genetic analysis. Alberta: University of Alberta, Molecular Biology and Biotechnology Centre, 1997. 1 v.

ZHOU, Y.; ZHOU, C.; YAO, H.; LIU, Y.; TU, R. Amplification of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb) cultivars. **Life Science Journal**, Xinxiang, v. 5, n. 4, p. 6-12, 2008.

7 CONCLUSÕES

1. Conclui-se nesse estudo que a espécie *D. trifida* é cultivada e consumida por comunidades tradicionais dos Estados de São Paulo, Santa Catarina e Mato Grosso, bem como comercializada em Santa Catarina e Amazonas;
2. Na maioria das comunidades visitadas não existe um sistema de fornecimento de túberas-sementes, ocorrendo a troca de túberas entre os agricultores locais, e consequentemente baixa incidência de introdução de novas variedades provenientes de outras áreas;
3. Embora não exista uma lista oficial de descritores para caracterização de *D. trifida*, o uso de descritores morfológicos de outras espécies de inhame são capazes de detectar variação entre os acessos, sendo que a cor da casca e da polpa dos tubérculos foram os mais relevantes para a distinção dos mesmos;
4. Tanto os marcadores SSR como ISSR foram úteis para estimar a diversidade genética e diferenciar os acessos de *D. trifida*. Entretanto, o marcador SSR detectou maiores índices de diversidade, enquanto que o marcador ISSR foi mais eficiente no agrupamento de diferentes genótipos, sendo capaz de separar os acessos do Amazonas;
5. Os acessos avaliados encontram-se levemente estruturados no espaço geográfico amostrado;
6. Como foram encontradas diferenças genéticas entre e dentro dos grupos de acessos provenientes das diferentes regiões visitadas, as estratégias de coleta e conservação devem amostrar um grande número de indivíduos dessas regiões, a fim de abranger toda a diversidade genética presente nesses materiais.

ANEXO

Roteiro das entrevistas realizadas com os agricultores tradicionais durante as coletas de *D. trifida* L.

a) Caracterização socioeconômica:

1. Data da Entrevista:	2. Local de ocupação nº:	3. Localização em GPS:
4. Município:	5. Bairro:	
6. Nome: 7. Sexo		8. Idade
9. Estado civil:	10. Nº de filhos:	
11. Residentes:	() Conjuge	Idade:
	() Filho (s)	Idade:
	() Filha (s)	Idade:
12. Local de nascimento do proprietário		
13. Local de nascimento do cônjuge		
14. Tempo de residência do proprietário no local		
15. Tempo de residência do cônjuge no local		
16. Local da última procedência da família		
17. Relação com a terra	() Proprietário	Extensão da área da propriedade:
		() Roça localizada no interior da propriedade
		() Outra situação
	() Caseiro	Extensão da área da propriedade:
		Extensão da área permitida para o uso do caseiro:
		() Roça própria localizda no propriedade
		() Outra situação
	() Posseiro	Extensão da posse:
		() Roça localizada no interior da posse
		() Roça localizada fora dos limites da própria posse
		() Outra situação
	() Outros	
18. Principal fonte de renda/subsistência:	() Aposentadoria	
	() Trabalho temporário	
	() Trabalho fixo	
	() Agricultura	
	() Outros	

b) Caracterização da (s) área (s) de cultivo:

1. Locais de cultivo de cará (inhame):	() Quintal
	() Roça
	() Roça e quintal

() Outros

2. Tamanho da (s) área (s) de cultivo:

3. Disposição das cultivares/variedades:

() Consorciadas

() Separadas

4. Tempo de uso da (s) área (s) de cultivo:

5. Nº de pessoas que trabalham / auxiliam na (s) área (s) de cultivo:

Familiares:

Não familiares:

6. Calendário de atividades

Limpeza/derrubada/roçada

Queima/coivara

Capina/ tratos culturais

Plantio

Colheita

7. Como é feita a escolha da área de roça?

8. Houve diminuição nas atividades agrícolas? Desde quando?

9. Por quanto tempo as áreas de roça são deixadas em pousio?

10. Sempre foi assim?:

11. Retorna às roças abandonadas? Por quê?

c) Caracterização da diversidade (variedades)

Diversidade de cará (inhame) presentes na (s) área (s) de cultivo e calendário de plantio e colheita.

1. Nomes das variedades

2. Épocas de plantio e colheita

3. Usos

4. Produção

5. Origem das variedades

6. Origem dos nomes

7. Tempo de plantio das variedades

9. Por que planta mais de uma variedade?

10. Já observou florescimento e frutificação nas variedades de cará? Em quais variedades?

11. Já observou germinação de semente nessas variedades? Em quais variedades?

12. Qual o modo de propagação utilizado?

13. Houve variedades de cará que plantou no passado e não planta mais? Por quê?

14. Aumentou a proporção de alguma variedade? Por quê?

15. Usa insumos ou implementos agrícolas? Quais?