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

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização genética de etnovariedades de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis/D. rotundata*

Lidinalva de Resende Gomes da Silva

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

Piracicaba
2012

Lidinalva de Resende Gomes da Silva
Bióloga

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização genética de etnovariedades de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis/D. rotundata*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

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

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

Piracicaba
2012

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

Silva, Lidinalva de Resende Gomes da
Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização genética de etnovariedades de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis/D. rotundata* / Lidinalva de Resende Gomes da Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2012.
78 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Diversidade genética 2. Etnobotânica 3. Inhame 4. Marcador molecular 5. Morfologia vegetal 6. Variedades vegetais I. Título

CDD 635.23
S586d

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

Ao Senhor Jesus, que em seu infinito amor me permitiu concluir este trabalho.

Ofereço

Aos meus Pais, Teresa Rosa de Resende Gomes e Sebastião Resende Gomes, à minha irmã Lindalva Gomes por ter cuidado muito bem do meu filho para finalizar esse trabalho e os meus tios Inês e Ribamar, por todo carinho.

Dedico

Ao meu esposo Márcio Dias e aos meus filhinhos tão pequeninhos e dependentes: David Resende e uma menina preste a nascer.

Dedico

A todos os meus professores que me incentivaram, me ajudaram na minha carreira acadêmica.

Dedico

Ao Povo Brasileiro, que através de seus impostos patrocinou meus estudos da Alfabetização a Pós-Graduação.

Agradeço

AGRADECIMENTOS

Á Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pelo completo apoio institucional.

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela opurtunidade oferecida para realização do curso de doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para este projeto.

A Professora Elizabeth Ann Veasey, pela total dedicação na orientação em todas as fases deste trabalho, possuidora de um admirável espírito humano, pela confiança e pela grande amizade. E não poderia deixar de expressar minha profunda gratidão pela compreensão e paciência demonstrada na minha “fase maternidade”. MUITO OBRIGADA!!!.

Aos demais professores do Departamento de Genética, da ESALQ/USP pelo apoio e pelos valiosos ensinamentos durante este curso.

A Pesquisadora Dra Maria Imaculada Zucchi do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pelos seus valiosos ensinamentos e pronta ajuda nos momentos que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Genética em especial: Berdan e Fernandinho, Carlos Macedônio pela amizade e carinho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada (LEEGA): Thiago Fonseca, Welligton Ferreira, Mike, Berenice, Gabriel, Aline Borges, Nancy, Marcos Siqueira, Daniele, pelo apoio e alegria de compartilhar bons momentos e pela ajuda no campo e no laboratório sem vocês meu trabalho teria sido bem mais difícil!

Todos os amigos e colegas da ESALQ e principalmente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento: Larissinha Castro, Maria Aparecida, Flávia Amorim, Fatinha Bosseti, Michelle Fonseca, Inocêncio, Onildo de Jesus, Eduardo Bressan, Thiago Falda, Guilherme Farias, Guilherme Pereira e vários outros amigos, pois a lista é grande...Graças a Deus..Pessoal muito obrigada por tudo que fizeram por mim, por todo carinho e ajuda. David (meu filho) também agradece.

Aos meus amigos da Associação dos Pós-Graduandos: Gabi, Celso, Paulinha, Berenice, Moisés, Gisele, Lú, Anderson e todos os membros atuais da APG, que compartilharam comigo o desejo e a luta por uma Pós-Graduação de qualidade. A todos os meus amigos dos diversos Programas da Pós-Graduação da ESALQ.

Ao Professor Dr. Edson Ferreira da Silva, UFRPE, pela amizade e auxilio nas coletas.

Ao setor de Assistência Social da ESALQ, pois ter me ajudando no momento que mais precisei, no auxílio moradia e alimentação.

A família Fava, em especial a Dona Irene Fava e o Senhor Masoeto, pelo carinho, amizade e por me receber muito bem na sua casa... Muito Obrigada e que Deus abençoe!

E a todos, que direta e indiretamente, colaboraram e incentivaram para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
LISTA DE FIGURAS 13
LISTA DE TABELAS 15
1.1 Objetivos 19
1.2 Hipóteses 20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.1 Sistemas agrícolas tradicionais e a conservação da agrobiodiversidade 21
2.2 Classificação botânica, origem, dispersão, sistema reprodutivo e importância econômica de *Dioscorea cayenensis/D.rotundata* 22
2.3 Marcadores microssatélites 25
2.4 Marcadores morfológicos em estudos de diversidade genética em *Dioscorea* spp 27
2.5 Marcadores moleculares em estudos de diversidade genética em *Dioscorea* spp 28
3 MATERIAL E MÉTODOS 31
3.1 Coleta dos materiais genéticos 31
3.2 Caracterização com marcadores morfológicos 33
3.3 Caracterização com marcadores microssatélites 34
3.3.1 Extração e quantificação de DNA total 34
3.3.2 Desenvolvimento de iniciadores microssatélites 35
3.3.3 Caracterização e genotipagem dos microssatélites 39
3.4 Análises estatísticas 41
4 RESULTADOS 43
4.1 Coleta do material genético 43
4.2 Caracterização com marcadores morfológicos 46
4.3 Caracterização com marcadores microssatélites 51
4.3.1 Extração e quantificação de DNA total 51
4.3.2 Desenvolvimento de iniciadores de microssatélites 52
4.3.3 Caracterização e genotipagem dos microssatélites 54
5 DISCUSSÃO 61
6 CONCLUSÕES 65
REFERÊNCIAS 67

ANEXO.....75

RESUMO

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização genética de etnovariedades de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis/D. rotundata*

O inhame é uma das principais culturas de raízes e tubérculos do mundo, com destaque para as espécies do complexo *Dioscorea cayenensis* Lam./*D. rotundata* Poir. Os cultivos de inhame são de suma importância tanto para a agricultura tradicional, como também para a agricultura familiar. No entanto, poucas pesquisas existem atualmente no Brasil com essas espécies, incluindo estudos de diversidade genética em inhame, que poderiam ser utilizados, principalmente, para melhor exploração e conservação genética *in situ/on farm* e também no melhoramento genético. Visto isso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade genética de etnovariedades de inhame (*Dioscorea cayenensis/D. rotundata*) provenientes de diversas regiões do Brasil, utilizando marcadores morfológicos e moleculares. Desta forma, foram realizadas coletas em diversos municípios da região Sul, Sudeste e Nordeste. Os tubérculos foram plantados em campo experimental, onde foram avaliados por 18 descritores morfológicos. Uma biblioteca genômica foi construída para a seleção dos fragmentos contendo marcadores microssatélites, a serem utilizados para estimar a diversidade genética, juntamente com os marcadores morfológicos. As bibliotecas resultaram em onze iniciadores, sendo que dez foram polimórficos, os quais foram utilizados para quantificar a variabilidade genética de 48 acessos (22 de *D. cayenensis* e 26 de *D. rotundata*). A identificação da espécie para cada acesso foi feita de acordo com a análise morfológica realizada. Foi observada elevada variabilidade genética para ambos os marcadores, morfológicos e microssatélites. Considerando a estruturação genética observou-se que a maior parte da variabilidade se encontra entre regiões e entre espécies, e essa variabilidade se encontra estruturada no espaço, havendo alta e significativa correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas, bem como alta correlação entre ambos os marcadores. Tanto as análises de agrupamento, como as análises de coordenadas principais, utilizando o índice de Jaccard, indicaram para ambos os marcadores a separação nítida dos acessos em dois grupos distintos: grupo I com acessos coletados na região Nordeste e grupo II com acessos coletados na região Sudeste, sendo que os acessos coletados na região Sul ficaram ou na zona intermediária entre os dois grupos, ou foram incluídos em um ou outro grupo. Diante desses dados pode-se inferir que no Brasil ocorre uma separação nítida entre as espécies *D. cayenensis* e *D. rotundata*, sendo que *D. cayenensis* ocorre principalmente nas regiões Sul e Sudeste, e *D. rotundata* ocorrem predominantemente na região do Nordeste.

Palavras-chave: Agricultura tradicional; Descritores morfológicos; Diversidade genética; Etnovariedades; Inhame; Microssatélites

ABSTRACT

Development of microsatellite markers and genetic characterization of yam (*Dioscorea cayenensis/D. rotundata*) landraces

Yam is one of the main roots and tuber crops in the world, especially within the species complex *Dioscorea cayenensis* Lam / *D. rotundata* Poir. The cultivation of yams is important both in traditional agriculture, and in family farming. However, few studies have been conducted in Brazil with these species, including genetic diversity studies, which could be used for *in situ/on farm* conservation genetics practices and also in plant breeding. As such, the objective of this study was to characterize the genetic diversity of yam (*Dioscorea cayenensis / D. rotundata*) landraces from different regions in Brazil, using morphological and molecular markers. Thus, collections were made in several municipalities in the South, Southeast and Northeast regions. The tubers were planted in an experimental field, where they were evaluated for 18 morphological traits. A genomic library was constructed for the selection of fragments containing microsatellite markers, used to estimate the genetic diversity, together with morphological markers. Libraries resulted in eleven primers, with ten primers showing polymorphism. These primers were used to quantify the genetic variability of 48 accessions (22 *D. cayenensis* and 26 *D. rotundata*). The species identification of the accessions was carried out in accordance with the morphological analysis performed. High genetic variability was observed for both morphological and microsatellite markers. Considering the genetic structure, most of the variability was found between regions and between species, and this variability was spatially structured, with high and significant correlation between genetic and geographical distances, as well as high correlation between both markers. The cluster analysis and the principal coordinate analysis using the Jaccard index, for both markers, showed a clear separation of accessions into two distinct groups: group I with accessions originated from the Northeast and group II with accessions originated in the Southeast region, while the accessions from the South were allocated either at an intermediate zone between the two groups, or included in either group. Given these data, one can infer that in Brazil there is a clear separation between the *D. cayenensis* and *D. rotundata* species, and that *D. cayenensis* occurs mainly in the Southeast and South regions, and *D. rotundata* occurs predominantly in the Northeast region.

Keywords: Genetic diversity; Landraces; Microsatellites; Morphological traits; Traditional agriculture; Yams

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Características morfológicas do complexo *Dioscorea cayenensis/D.rotundata.* (A) planta, (B) caule com espinhos, (C) inflorescência e (D) tubérculos. 24

Figura 2 - Locais de coleta dos acessos do complexo *D.cayenensis/D. rotundata.* 32

Figura 3 - Gráfico de dispersão para a análise de coordenadas principais utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard para 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata*, de três regiões: Sudeste (azul), Sul (verde) e Nordeste (vermelho), avaliados com marcadores morfológicos..... 49

Figura 4 - Dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e método agromerativo de Neighbor-Joining para 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata*, de três regiões: Sudeste (azul), Sul (verde) e Nordeste (vermelho), avaliados com marcadores morfológicos..... 50

Figura 5 - Gel de quantificação em agarose a 0,8% (p/v) corado com corante Sybr Green e comparada a padrões com pesos moleculares e concentrações específicas (DNA do fago) com a metodologia Doyle e Doyle (1990) com folhas liofilizadas..... 51

Figura 6 - Gráfico de dispersão para a análise de coordenadas principais utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard para 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata*, de três regiões: Sudeste (azul), Sul (verde) e Nordeste (vermelho), avaliados com marcadores microssatélites. 57

Figura 7- Dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e método agromerativo de Neighbor-Joining para 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata*, de três regiões: Sudeste (azul), Sul (verde) e Nordeste (vermelho), avaliados com marcadores microssatélites. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracteres utilizados para a caracterização morfológica do complexo *D. cayenensis/D. rotundata.* 34

Tabela 2 - Nomes vernaculares, freqüência de citações e número de agricultores por Estado para variedades de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis/D. rotuundata.*..... 45

Tabela 3 - Relação dos acessos de *D. cayenensis/D. rotundata* utilizados nesse estudo, número de identificação dos acessos mantidos no banco de germoplasma do Departamento de Genética (DGC), município, comunidade de coleta, nome popular e coordenadas geográficas. 46

Tabela 4 - Análise de variação molecular (AMOVA) para 48 acessos de inhame (*Dioscorea cayenensis/ D. rotundata*) originários de três regiões do Brasil: sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo) e nordeste (Pernambuco e Paraíba), avaliados com 18 caracteres morfológicos. 50

Tabela 5 - Análise de variação molecular (AMOVA) para 22 acessos da espécie *Dioscorea cayenensis* e 26 acessos de *D. rotundata*, originários de três regiões do Brasil: sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo) e nordeste (Pernambuco e Paraíba), avaliados com 18 caracteres morfológicos..... 51

Tabela 6 - Relação dos iniciadores que foram sintetizados para o complexo *Dioscorea cayenensis/D.rotundata,* incluindo os nomes do iniciadores, a sequência dos mesmos, a temperatura (Tm), tamanho do iniciador, tamanho do fragmento seqüenciado, tamanho da sequência, o motivo, a percentagem de citocina/guanina (CG%) e o tipo de microssatélite, em relação à unidade repetitiva. 53

Tabela 7 - Amplificação dos iniciadores para cinco indivíduos do complexo *D. cayenensis/D. rotundata* em gel de poliacrilamida 7%, incluindo o motivo dos iniciadores, o tamanho e amplitude das bandas esperadas e observadas no gel e o tipo de esquema do *Touchdown.* 54

Tabela 8 - Valores referente ao número de bandas e ao conteúdo de polimorfismo (PIC)..... 55

Tabela 9 - Análise da diversidade genética gerada apartir dos marcadores microssatélites, pelo Índice de Shannon entre os acessos das espécies *D. cayenensis e D. rotundata* e entre as regiões de coleta de inhame (*Dioscorea cayenensis/D.rotundata*)..... 56

Tabela 10 - Análise de variação molecular (AMOVA) para 48 acessos de inhame (*Dioscorea cayenensis/ D. rotundata*) originários de três regiões do Brasil: sul (Santa

Catarina), sudeste (São Paulo) e nordeste (Pernambuco e Paraíba), avaliados com dez iniciadores microssatélites. 59

Tabela 11 - Análise de variação molecular (AMOVA) para 22 acessos da espécie *Dioscorea. cayenensis*) e 26 acessos de *D. rotundata*, originários de três regiões do Brasil: sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo) e nordeste (Pernambuco e Paraíba), avaliados com dez primers de microssatélites. 59

1 INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea* spp.) representa atualmente a quarta cultura de raízes e tubérculos mais importante do mundo, logo atrás da batata (*Solanum tuberosum* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e batata-doce (*Ipomoea batatas* L.). É extremamente importante na alimentação dos povos de alguns países da África, Ásia e da América Latina, constituindo-se a alimentação básica para mais de 100 milhões de pessoas em todo mundo, sobretudo nos trópicos úmidos e sub-úmidos (FAO, 2011). Tem importante papel social, na segurança nutricional e na sustentabilidade da agricultura de diversos países dos cinco continentes.

Estimativas da FAO (2011) indicam que em 2009 foram colhidos cerca de 4,7 milhões de hectares de inhame, que geraram 49,2 milhões de toneladas de tubérculos. Neste cenário, a África detém a hegemonia, ao responder por cerca de 96% do total produzido de inhame, sendo que três países desse continente se destacam: Gana, Costa do Marfim e Nigéria, os quais são responsáveis por cerca de 85% da produção mundial de inhame. Nesse continente, o inhame é a segunda mais importante cultura de raízes e tubérculos, depois da mandioca, tendo se destacado as espécies *Dioscorea cayenensis e D. rotundata*. Essas espécies de inhame são as mais cultivadas no mundo e representam cerca de 90% da produção mundial.

A inserção do Brasil no mercado internacional de inhame ainda é pequena (0,5% da produção mundial, com cerca de 230 mil toneladas cultivadas em 25.129 ha) (FAO, 2011). Embora haja registros de cultivo de *Dioscorea* no país desde os primórdios da colonização, desperdiçando a sua imensa aptidão edafoclimática para a exploração dessa cultura e as inúmeras possibilidades de negócios que adviriam em cadeias produtivas estruturadas. O Nordeste do Brasil detém cerca de 90% da produção nacional de *Dioscorea* spp., com destaque para os Estados da Paraíba (56 mil toneladas), Pernambuco (50 mil toneladas), Alagoas, Bahia e Maranhão, sendo que nestes municípios se destacam essencialmente as espécies ou o complexo de espécies *D. cayenensis/D. rotundata* e logo em seguida a espécie *D. alata* (Santos, 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, destacando-se neste caso a espécie *D. alata* (MONTEIRO, 2002).

Em relação aos aspectos nutricionais para a alimentação humana, os tubérculos de inhame são ricos em vitaminas, principalmente do complexo B e carboidratos, em especial grãos de amido. Possui também apreciáveis teores de vitamina A, vitamina D, e vitamina C (ácido ascórbico), além de ser uma boa fonte dos minerais como: potássio, sódio, cálcio,

ferro, magnésio e fósforo. Outra importância relatada desses tubérculos são as propriedades medicinais, tais como a obtenção de sapogeninas esteroidais, utilizadas na produção de cortisona e hormônios esteróides sintéticos (CEREDA, 2002). Na área da saúde, pode-se citar estudos etnobotânicos conduzidos junto a moradores locais em comunidades tradicionais no Estado de Enugu, na Nigéria, que revelaram a grande aplicabilidade das folhas de *D. alata* para reduzir a febre e os tubérculos de *D. cayenensis* para combater problemas estomacais, controle do colesterol, infecções fúngicas, bacterianas e viróticas (AIYELOJA & BELLO, 2006).

As espécies *D. cayenensis* (inhame amarelo) *e D. rotundata* (inhame branco), podem ser referidas também como inhame ou cará da Guiné. São plantas perenes, poliplóides, dióicas, se caracterizam por possuírem caule herbáceo, escadente (trepador) e com espinhos. Existem ainda grandes controvérsias sobre a taxonomia e a citogenética dessas espécies. Alguns autores consideram duas espécies diferentes (SCARCELLI et al., 2006; TOSTAIN et al., 2007) enquanto outros consideram ambas como parte de um complexo de espécies (DANSI et al., 2001; MIGNOUNA et al., 2002).

Os cultivos de inhame são de suma importância tanto para a agricultura tradicional como também para a agricultura familiar. Um exemplo disso ocorre na região sul do Estado de São Paulo, mais especificamente no Vale do Ribeira. Estudos realizados por Peroni & Hanazaki (2002) mostram que a cultura do inhame ocupa o segundo lugar em relação o número de variedades cultivadas (29 variedades), juntamente com a batata-doce e logo atrás da mandioca com 62 variedades. Em relação ao gênero *Dioscorea* destaca-se nesta região as espécies: *D. trifida*, *D. cayenensis*, *D. alata* e *D. bulbifera* (BRESSAN et al., 2005). Estas espécies são mantidas sob cultivo pelos agricultores que possuem notável habilidade de combinação ecológica que permite manter e gerar diversidade genética (MARTINS, 2005). Entretanto, o risco de perda desta diversidade é grande principalmente devido a pressões sócio-econômicas sofridas por esses agricultores. Esta realidade reforça a necessidade de realizar expedições de coleta a fim de preservar esses recursos genéticos por meio de práticas de conservação *ex situ*, e que permitam também a sua utilização em programas de melhoramento. Neste aspecto a caracterização da variabilidade genética é de suma importância por possibilitar a elaboração de estratégias de conservação e manutenção da diversidade.

Diversas técnicas estão disponíveis para estudar a variabilidade genética tanto em nível de marcadores morfológicos e moleculares. Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) vêm se destacando com sua eficiência,

sendo os mais utilizados nesses tipos de estudos. Os SSRs são marcadores codominantes, estão ampla e uniformemente distribuídos pelo genoma dos eucariotos; são altamente multialélicos; são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA; uma vez desenvolvidos os *primers* que amplificam tais regiões do genoma, podem ser facilmente estudados (AGARWAL et al., 2008).

O inhame, representado pelo complexo de espécies *D. cayenensis/D.rotundata*, foi escolhido nesse estudo por ser uma espécie importante na agricultura tradicional no Brasil e no mundo. É uma cultura pouco explorada no Brasil em termos de melhoramento genético ou mesmo para estudos básicos de genética ou evolutivos, representando um sério risco quanto à perda de diversidade genética. O conjunto de informações geradas nesse estudo reforça a importância da identificação e conservação genética *in situ* pelos agricultores tradicionais para geração e manutenção da variabilidade gênica.

1.1 Objetivos

O objetivo geral foi de caracterizar a diversidade genética de etnovariedades de inhame (*Dioscorea cayenensis/rotundata*) provenientes de diversas regiões do Brasil, utilizando marcadores morfológicos e moleculares. Sendo que os objetivos específicos foram:

- Realizar um levantamento etnobotânico a respeito do manejo, dos usos, da nomenclatura local, do tempo de uso e origem das etnovariedades de inhame do complexo *D. cayenensis /D.rotundata* em diversas regiões do Brasil;
- Desenvolver *primers* de microssatélites para o complexo *D. cayenensis*/*D. rotuntada*, por meio da tecnologia de biblioteca genômica enriquecida;
- Caracterizar a diversidade genética de 48 etnovariedades pertencentes ao complexo *D. cayenensis*/*D. rotundata*, coletadas em roças de agricultura familiar e/ou tradicional do Vale do Ribeira, do litoral Norte do Estado de São Paulo, do litoral central e norte de Santa Catarina, da Zona da Mata da Paraíba e Zona da Mata e Agreste de Pernambuco, utilizando marcadores morfológicos e microssatélites;
- Realizar uma análise comparativa considerando dois níveis de análise quanto à estruturação da diversidade genética de etnovariedades de inhame (entre e dentro de espécies, considerando separadamente as espécies *D. cayenensis* e *D. rotundata*), e entre e dentro de regiões – nordeste, sudeste e sul);
- Estimar a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas baseadas em dados morfológicos e de microssatélites;
- Estimar a correlação entre os dois marcadores: morfológicos e microssatélites.

1.2 Hipóteses

- Existe grande variabilidade genética para as etnovariedades de inhame cultivadas nas diversas regiões do Brasil;
- Os marcadores microssatélites são mais informativos quando comparados com os marcadores morfológicos;
- A variabilidade genética não se encontra estruturada no espaço, portanto, não há correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas agrícolas tradicionais e a conservação da agrobiodiversidade

Existe atualmente maior interesse em relação à manutenção da diversidade genética *in situ*, por meio dos agricultores tradicionais, pois esse tipo de agricultura constitui uma importante modo de conservação da agrobiodiversidade, pois várias as espécies são cultivadas numa mesma área mantida pelos agricultores (MARTINS, 2005; PERONI; HANAZAKI, 2002; AMOROZO, 2008).

Os sistemas agrícolas praticados pelas populações tradicionais são caracterizados, entre outros fatores, pela intensa utilização dos recursos naturais (MARTINS, 2005). Esse tipo de agricultura tem como unidade básica evolutiva a "roça", que é uma associação de diferentes espécies, onde cada uma delas tem sua história, ou seja, parte delas foram trazidas pelos colonizadores e parte chegou antes dos mesmos. Segundo este autor, além da diversidade de origens, o que impressiona é o fato de que não se trata de uma composição de espécies totalmente aleatória, mas uma associação de espécies que minimiza a competição e maximiza a utilização de recursos, que são limitados. As roças são locais de alta diversidade, observando-se, além disso, diferenças substanciais na composição e diversidade das plantas, bem como na fonte ou origem de materiais entre as diferentes roças. Esta diversidade é de extrema importância, tanto no que diz respeito à segurança alimentar, quanto em relação à preservação e ao melhoramento genético das espécies.

Assim sendo, a conservação dos recursos genéticos *in situ* pelos agricultores tradicionais tem papel fundamental, principalmente por minimizar o estreitamento da base genética das espécies cultivadas que vem ocorrendo nos últimos anos em conseqüência do modelo de agricultura da Revolução Verde, e as limitações da conservação *ex situ*, demasiadamente onerosa e de difícil manutenção (CLEMENT et al., 2008; AMOROZO, 2000). Além disso, a manutenção da agrobiodiversidade dos agroecossistemas tradicionais contribui para a adaptabilidade das populações humanas, uma vez que fornece garantias de sobrevivência para o agricultor. Entretanto, apesar do importante papel dos agricultores para a conservação da biodiversidade, inúmeros fatores têm se constituído em riscos para esta, tais como pressões do mercado, êxodo rural e a globalização, que mina as culturas locais (inclusive os hábitos alimentares, baseados no consumo de uma pequena variedade de alimentos) em prol de uma supremacia cultural reducionista, advinda dos países desenvolvidos (ALTIERI, 1991; BRUSH, 2000).

Vários estudos com etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de diversas regiões do Brasil, principalmente do litoral de São Paulo, Amazônia, Minas Gerais e, mais recentemente, do nordeste do Mato Grosso do Sul, têm mostrado grande potencial deste tipo de agricultura na geração e manutenção da diversidade genética intra-específica para esta cultura (CURY, 1998; PERONI et al., 1999; MÜHLEN et al., 2000; FARALDO et al., 2000; PERONI et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2009, 2010). Esses trabalhos acumularam um grande conhecimento sobre a ecologia e a genética de populações de mandioca sob sistemas de agricultura tradicional, e permitiram o estabelecimento de um modelo explicativo bastante avançado da dinâmica evolutiva desta cultura (CURY, 1993; MARTINS, 2005). Estudos nesta linha de pesquisa com outras culturas produtoras de raízes e tubérculos, como as espécies de inhame (*Dioscorea* spp.) e batata-doce, têm sido conduzidos (BRESSAN, 2005; BRESSAN et al., 2005, 2011; VEASEY et al., 2007, 2008), onde se tem procurado entender como a diversidade genética encontra-se distribuída e estruturada nessas espécies gerando maiores conhecimentos sobre a dinâmica evolutiva dessas culturas em sistemas agrícolas tradicionais.

2.2 Classificação botânica, origem, dispersão, sistema reprodutivo e importância econômica de *Dioscorea cayenensis/D.rotundata*

Os inhames se agrupam na classe das monocotiledôneas, e pertencem à família Dioscoreaceae e gênero *Dioscorea*, o mais importante economicamente e o único que ocorre no Brasil. Este gênero é o maior da família e apresenta mais de 600 espécies. São importantes alimentos para as regiões tropicais e subtropicais (AYENSU 1972).

Existem em torno de dez espécies cultivadas de inhame no mundo, pertencentes a cinco seções: Enantiophyllum (*D. alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. rotundata* Poir., *D. nummularia* Lam., *D. opposita* Thunb. and *D. transversa* R.Br.), Combilium (*D. esculenta* Burk.), Opsophyton (*D. bulbifera* L.), Macrogynodium (*D. trifida* L.) and Lasiophyton (*D. pentaphylla* L.) (LEBOT, 2009), sendo que as ss principais são *D. rotundata, D. cayenensis,* espécies de origem africanas, pois nesse continente pode-se encontrar espécies selvagens relacionadas. Já *D. alata* e *D. trifida,* foram domesticadas independentemente no Sudeste da Ásia e na América, respectivamente. Quanto as características da planta as espécies *D. alata, D. rotundata e D. cayenensis*, apresentam enrolamento anti-horário, caule alado e folhas inteiras. Já a espécie *D. trifida* é caracterizada por enrolamento horário, caule alado e folhas lobadas. A dispersão de todas as espécies para a civilização ocidental se deu com a intensificação do tráfico de escravos (ABRAMO, 1990).

Estima-se que no Brasil ocorram entre 150 e 200 espécies de *Dioscorea*, sendo este o único gênero da família presente em todas as regiões do país, desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul. Em termos de importância econômica merece destaque, as espécies *D. alata, D. cayenensis* e *D. rotundata*, já as espécies *D. bulbifera* e *D. opposita* tem menor expressão em nível comercial (PEDRALLI, 2002) e *D. trifida* (VEASEY et al., 2010).

As espécies *D. cayenensis*, conhecida também como inhame amarelo, e/ou *D. rotundata*, as quais apresentam tubérculos brancos ou amarelos, são cultivadas principalmente no litoral nordestino, produz poucos rizomas por planta mas de grande tamanho. São plantas herbáceas, trepadeiras quando encontram um suporte; apresentam raiz tuberosa; caule volúvel, com cerca de 5 mm de diâmetro; folhas opostas com cerca de 7 cm de comprimento e 4,5 cm de largura; flores unissexuais, dispostas em inflorescência do tipo espiga (Figura 1). Apresentam túberas cilíndricas e de tamanho variável, geralmente de 1 a 10 kg. O florescimento dessas plantas no Brasil é raro e os frutos, quando formados, são cápsulas deiscentes. Quanto ao sistema reprodutivo, a espécie se reproduz por alogamia. A propagação pode ser feita pelos tubérculos, ou seja, por propagação vegetativa, ou por sementes (SANTOS, 2002).

Embora as espécies *D. rotundata* e *D. cayenensis*, conhecidas também como "inhame da Guiné", sejam muito parecidas, vários autores reconhecem-as como espécies diferentes (AYENSU, 1972; AKORODA; CHHEDA, 1983; CHAIR et al., 2005; SCARCELLI et al., 2006; TOSTAIN et al., 2007), entrentanto outros autores, as consideram como sendo parte de um complexo de espécies: *D. cayenensis/D. rotundata*, em função das semelhanças morfológicas e/ou moleculares observadas entre ambas (HAMON & TOURE, 1990; DANSI et al., 1999, 2000a,b, 2001; MIGNOUNA et al., 2002). No entanto, há algumas diferenças morfológicas básicas que as distinguem, tais como a cor do tubérculo (branco para *D. rotundata* e amarelo para *D. cayenensis*), forma da folha (ovalada para *D. rotundata* e orbiculada para *D. cayenensis*), produção de tubérculos (precoce para *D. rotundata* e tardio para *D. cayenensis*), entre outras (MARTIN & DEGRAS, 1978), mas mesmo assim há dificuldades na sua correta identificação.

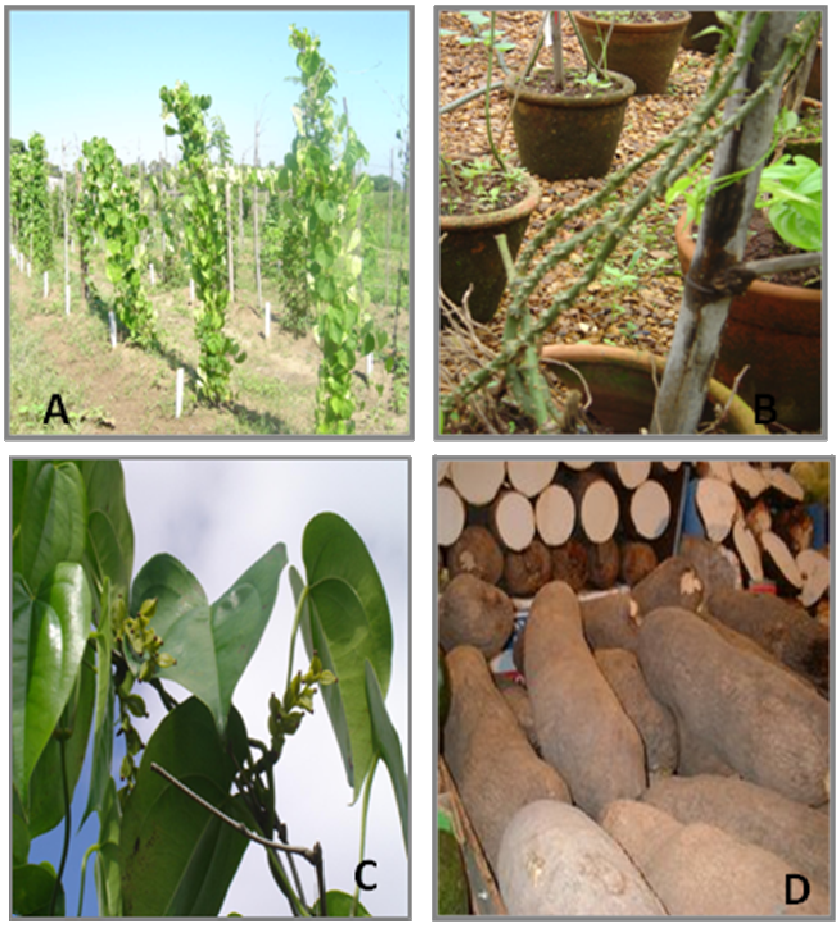

Figura 1- Características morfológicas do complexo *Dioscorea cayenensis/D.rotundata.* (A) planta, (B) caule com espinhos, (C) inflorescência e (D) tubérculos. Fonte: ESALQ/USP.

Estudos citogenéticos em espécies de *Dioscorea* ainda são bastante contraditórios. Com base nas análises do padrão de segregação de microssatélites, Scarcelli et al. (2005) e Bousalem et al. (2006) chegaram a conclusão de que as espécies *D. rotundata* e *D. trifida*, previamente assumidas como tetraplóide e octoplóide, respectivamente, são na verdade diplóide ($2n$ = 2x = 40) e tetraplóide ($2n$ = 4x= 80), respectivamente. Outro estudo recente, também baseado em analises de segregação de microssatélites, revelou que os acessos de *D. alata* com $2n$ = 40, 60 e 80 cromossomos são diplóides, triplóides e tetraplóides, respectivamente, e não tetraplóides, hexaplóides e octoplóides como normalmente assumidos (ARNAU et al., 2009). Acrescenta-se ainda que esses resultados foram confirmados por padrões de segregação de isoenzimas para espécies de *D. rotundata*. Esses estudos foram realizados para evidenciar que o número básico de cromossomos dessas espécies seria x = 20 e não x = 10 como se acreditava antes. No entanto, um estudo mais recente (OBIDIEGWU et al., 2009) mostra que no complexo *D. cayenensis/D. rotundata* encontram-se acessos tetraplóides, hexaplóides e octaplóides.

A maioria das variedades cultivadas de inhame são acessos selecionados pelos agricultores entre as variedades locais antigas. O melhoramento de inhame não tem sido realizado com sucesso até recentemente. Somente nos anos de 1960 foram iniciados os primeiros trabalhos de melhoramento de inhame comestível, com a espécie *D. trifida* no Caribe (DEGRAS, 1969), seguido por *D. rotundata* nos anos 1970 na Nigéria (SADIK & OKEREKE, 1975), e só recentemente nos anos 1980 com *D. alata* na Índia (ABRAHAM et al., 1986). A falta de conhecimento sobre a origem, diversidade e da genética dessas espécies têm limitado muito a eficiência dos programas de melhoramento genético.

2.3 Marcadores microssatélites

Existem vários tipos de marcadores moleculares, dentre os quais se destaca os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), que fazem parte das seqüências simples de DNA repetitivo encontradas no genoma principalmente de eucariotos. Observa-se microssatélites tanto em regiões codificadoras como não codificadoras e são, freqüentemente, muito polimórficos devido ao alto nível de variação no número de repetições (ELLEGREN, 2004). Em plantas, sabe-se que os sítios de microssatélites estão amplamente distribuídos, com uma freqüência de um a cada 50 mil pares de bases, sendo o di-nucleotídeo AT o elemento repetido mais comum. Foi verificado também que a quantidade de DNA de cópia única no genoma e a freqüência de microssatélites é inversamente correlacionada ao tamanho do genoma (MORGANTE et al., 2002).

Os microssatélites são regiões do genoma que estão sob taxas de mutação muito elevadas, que variam de loco para loco, sendo esta variação de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco, por geração. A dinâmica do processo mutacional dos SSR até hoje não é bem conhecida, no entanto diferentes hipóteses têm sido formuladas para explicar tal mecanismo sendo que a mais aceita é que durante o pareamento meiótico, pode ocorrer *crossing-over* desigual devido à natureza repetida das seqüências. Este mecanismo pode ser responsável pelas altas taxas de polimorfismo dos microssatélites e são estas mutações que tornam esses marcadores tão informativos do ponto de vista genético, pois muitos alelos são gerados por loco. O polimorfismo de um loco microssatélite é resultado do número de repetições do motivo que o caracteriza. Portanto, os diferentes alelos que um loco microssatélite pode apresentar distinguem-se uns dos outros pelo número de repetições que apresentam (OLIVEIRA et al., 2006).

Os microssatélites podem ser classificados conforme a composição das seqüências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo:

GTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTGTAGTGTGTGT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas de maneira adjacentes, por exemplo: GTGTGTGTGTGTCACACACACACA. Ainda podem ser classificados em relação à unidade repetitiva, como mononucleotídica, dinucleotídica, trinucleotídica, pentanucleotídica e hexanucleotídica (OLIVEIRA et al., 2006).

Os SSR possuem características desejáveis para serem utilizados em estudos de genética de populações, sendo os mais empregados em estudos populacionais (TOSTAIN et al., 2007). Eles são co-dominantes, multialélicos, apresentam segregação mendeliana simples, sua expressão não é influenciada pelo ambiente, e a amplificação é via PCR. Desta forma, são de fácil detecção e podem utilizar iniciadores marcados com fluorescência, onde apresentam a vantagem de possibilitarem o sistema multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo. Além de curtas repetições em tandem, as seqüências que flanqueiam os SSR (iniciadores) são geralmente conservadas entre os indivíduos da mesma espécie, sendo que podem ser transferíveis entre populações e espécies do mesmo gênero (ALVES et al., 2007). A principal limitação deste marcador refere-se ao elevado custo no desenvolvimento dos iniciadores, porém este é facilmente compensado pela ampla potencialidade de pesquisas desenvolvidas após a sua obtenção.

Vários estudos vêm demonstrando a utilização de iniciadores heterólogos ou transferibilidade heteróloga, resultando em uma minimização dos custos de implementação desses marcadores em espécies que apresentam uma baixa frequência de microssatélites, ou naquelas em que as sequências de DNA repetitivo são de difícil isolamento. Alguns estudos relatam altas taxas de transferibilidade em espécies pertencentes ao mesmo gênero (AUREA et al., 2008; GIMENEZ et al., 2007; ALVES et al., 2006).

Para se trabalhar com marcadores microssatélites, de início pode-se procurar por sequências desta natureza em bancos de dados disponíveis, ou desenvolvimento de uma biblioteca genômica enriquecida para isolar tais sequências. Em inhame (*D. cayenensis*) a construção dessas bibliotecas é importante, pois até a presente dara não há sequências de microssatélites disponíveis para esta espécie no GeneBank (http://www.ncbi.gov).

Dentre as várias metodologias para o isolamento de microssatélites em plantas, o método de bibliotecas enriquecidas é o mais utilizado, apresentando maior eficiência e relativa baixa demanda de recursos principalmente quando o objetivo é estudar distâncias genéticas entre populações (ZANE et al., 2002). Devido ao desenvolvimento de protocolos

cada vez mais otimizados e às tecnologias de seqüenciamento automático, o desenvolvimento de iniciadores de microssatélites tem se tornado mais acessível.

Os marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética em espécies poliplóides. Para essas espécies, quando não se conhece os parentais diplóides, não há como se ter informações sobre os padrões de segregação dos marcadores co-dominantes, como os microssatélites. Desta forma, estes estudos avaliam os microssatélites como se fossem marcadores dominantes, considerando a presença e ausência de bandas. Dentre estes estudos, podem-se citar alguns trabalhos conduzidos com a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), por Cordeiro et al. (2000), batata (*Solanum tuberosum*), tais como Ispizúa et al. (2007), Mathias et al. (2007), trigo (*Triticum aestivum*), tais como os de Zhang et al. (2006), tetraplóide (*Triticum durum*), avaliado por Ganeva et al. (2009), batata-doce (*Ipomoea batatas*), tais como Veasey et al. (2008) e Arizio et al. (2009), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), avaliado por Freitas et al. (2007), entre outros.

2.4 Marcadores morfológicos em estudos de diversidade genética em *Dioscorea* spp

Para a cultura do inhame, os caracteres utilizados na caracterização morfológica, bem como na identificação de espécies de *Dioscorea*, foram estabelecidos pelo International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) e International Institute of Tropical Agriculture (IITA) (IPGRI/IITA,1997). Existe uma imensa lista de descritores, tanto morfológicos como agronômicos que podem ser empregados para a caracterização da diversidade genética das espécies de inhame.

Diversos estudos com marcadores morfológicos foram utilizados para quantificar a diversidade genética do complexo *D. cayenensis/D. rotundata*. 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 espigueta. Dansi et al. (1999) caracterizaram 560 acessos do complexo *D. cayenenis*/*D. rotundata* da República de Benin. Noventa morfotipos foram identificados e uma chave de identificação de cultivares foi proposta. Nesse estudo observaram-se também uma relação entre os morfotipos analisados e parentes silvestres do complexo acima (*D. abyssinica, D. praehensilis* e *D. burkilliana*), porém os autores sugerem estudos moleculares principalmente os que utilizam DNA.

Melo Filho et al. (2000) caracterizaram morfologicamente 11 acessos de *Dioscorea* spp. da coleção de inhame da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Observaram que dentre os descritores analisados, o comprimento e a largura da folha foram os de maior contribuição na discriminação dos acessos. A porcentagem de variância acumulada para o 1º e 2º componentes principais foi de 89% da variação total. Na análise de agrupamento observaram a formação de seis grupos representando os acessos de *Dioscorea* spp. Bressan (2005) utilizou 24 descritores morfológicos para avaliar 21 etnovariedades de *D. cayenensis* originárias do Vale do Ribeira e dois acessos de *D. rotundata*, não observando separação das espécies do complexo *D. cayenensis*/*D. rotundata* como ocorreu na avaliação isoenzimática, mas mostrando a presença de dois grupos (Iguape e Cananéia) na análise de agrupamento, o que pode estar indicando a influência das unidades culturais sobre a variação morfológica. O autor concluiu também que a maior parte da variabilidade morfológica encontra-se entre roças dentro de comunidades (44,8%). Já Bressan et al. (2011), avaliando 16 etnovariedades de *D. alata* originárias do Vale do Ribeira, SP, comparando-as com 19 variedades comerciais, concluiu que 67% dos 24 descritores morfológicos utilizados foram discriminatórios e que a maior parte da variabilidade observada (70%) para as etnovariedades encontra-se dentro de roças.

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.

Atualmente, têm-se utilizado a associação de marcadores morfológicos e moleculares, principalmente aqueles que utilizam o DNA, possibilitando grandes avanços na descrição da divergência genética entre acessos. Sendo que a variabilidade genética só pode ser eficientemente utilizada se for devidamente avaliada e quantificada.

2.5 Marcadores moleculares em estudos de diversidade genética em *Dioscorea* spp

Marcadores isoenzimáticos foram utilizados em *Dioscorea* para o estudo da 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 do complexo *D. cayenensis/D. rotundata*, originários de países da África (DANSI et al., 2000a; MIGNOUNA et al., 2002), bem como no entendimento de padrões de segregação para locos isoenzimáticos em *D. rotundata*

(SCARCELLI et al., 2005). No Brasil, marcadores isoenzimáticos foram utilizados para o estudo da diversidade genética entre etnovariedades do Vale do Ribeira das espécies *D. trifida*, *D. cayenensis*, *D. alata* e *D. bulbifera* (BRESSAN, 2005; BRESSAN et al., 2011), constatando-se alta variabilidade genética mantida pelos agricultores desta região, sendo que tal variabilidade não se encontra estruturada no espaço.

Já os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA) foram utilizados para avaliar cultivares das espécies *D. alata, D. cayenensis, D. rotundata, D. trifida e D. esculenta* (ASEMOTA et al., 1996; ZANNOU et al., 2009), no estudo do complexo *D. cayenensis/D. rotundata* (DANSI et al., 2000b), e para avaliar a variabilidade intra-específica em acessos de *D. bulbifera* originários da África, Ásia e Polinésia (RAMSER et al., 1996). 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 os cultivares classificados como *D. cayenensis* deveriam ser considerados como um táxon separado de *D. rotundata*. O marcador AFLP foi também utilizado para avaliar a diversidade genética em *D. alata* e sua relação com outras nove espécies comestíveis de *Dioscorea* (MALAPA et al., 2005). Tamiru et al. (2007) também utilizaram marcadores AFLP para verificar a diversidade genética entre várias espécies de *Dioscorea*, inclusive os inhame africanos, e desta forma eles também revelaram a separação nítida das espécies *D. cayenensis* e *D. rodundata*. Scarcelli et al. (2006) usaram esses mesmos marcadores em estudos sobre a domesticação do gênero *Dioscorea.*

Em relação à utilização de marcadores SSR para a espécie *D. cayenensis,* existem ainda poucos estudos na literatura. Ramser et al. (1997) estudaram a taxonomia e filogenia das espécies *D. cayenenis-D. rodundata* através de marcadores RAPD, microssatélites e DNA cloroplastial. Observaram a separação nítida dessas duas espécies e a formação de dois grandes grupos. Utilizando a AMOVA (análise de variância molecular) os autores observaram que a maior parte da variabilidade genética encontrava se entre os grupos de acessos (89,2%), ou seja, entre as espécies, considerando que cada grupo representava acessos de uma das espécies. Em relação aos prováveis progenitores, esse estudo mostra que a espécie *D. cayenensis* é um híbrido assimétrico, onde os prováveis progenitores masculinos são: *D. togoensis*, *D. burkilliana, D. minutiflora* ou *D. smilacifolia* e os progenitores femininos são: *D. rotundata, D. praehensilis, D. abyssinica* ou *D. liebrechtsiana*.

Acessos de *D. rotundata* foram avaliados por Mignouna et al. (2003) utilizando nove pares de inicadores SSR desenvolvidos para batata (*Solanum tuberosum*), além de outros marcadores (AFLP e RAPD). *D. rotundata* foi também avaliada com seis locos SSR por Scarcelli et al. (2005), concluindo inclusive, a partir da segregação desses marcadores, além de dois locos isoenzimáticos, que os acessos avaliados desta espécie eram diplóides. Tostain et al. (2007) realizaram um estudo com 146 acessos de *D. rotundata* utilizando dez pares de iniciadores heterólogos de SSR observando-se elevada diversidade genética e também uma baixa mas significativa correlação entre a diversidade genética e as distâncias geográficas, mostrando uma leve estruturação espacial.

O primeiro estudo publicado para desenvolvimento de iniciadores microssatélites em *Dioscorea* spp. foi o de Mizuki et al. (2005), que desenvolveram dez pares de iniciadores para a espécie asiática *D. japonica.* Tostain et al. (2006) desenvolveram 16 pares de iniciadores para a espécie cultivada *D. alata* e para as espécies selvagens *D. abyssinica* e *D. praehensilis*, havendo possibilidade de transferência de até 80%, para as espécies cultivadas *D. cayenensis e D. rotundata*. Posteriomente, Hochu et al. (2006) desenvolveram oito iniciadores específicos para *D. trifida*, sendo que seis desses também amplificaram regiões de microssatélites em *D. cayenensis e D.rodundata*. E nove pares de iniciadores polimórficos também foram desenvolvidos mais recentemente para *D. alata* por Siqueira et al. (2011), sendo que quatro destes iniciadores apresentaram transferibilidade para as espécies *D. cayenensis/D. rotundata*.

Estudos com marcadores microssatélites com iniciadores específicos no complexo *Dioscorea cayenenis/D. rotundata* ainda não existem na literatura científica, no entanto são necessários o desenvolvimento de tais oligononucleotídeos para melhor entendimento da variabilidade genética dessas espécies e melhor esclarecimento sobre a relação desses grupos taxonômicos, visto a grande importância sócio-econômica que essas espécies exercem na agricultura tradicional no Brasil e no mundo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos materiais genéticos

Realizaram-se quatro expedições de coleta de etnovariedades de inhame (*Dioscorea cayenensis/D. rodundata*) entre os anos 2008 e 2009. Na região Nordeste foram visitados agricultores da Zona da Mata dos Estados da Paraíba (PB), nos municípios de Alhandra, Caaporã, Mamanguapé, Marcação, Riachão, Rio Tinto, Santa Rita, Sapé e Sobrado, e Pernambuco (PE), nos municípios de Aliança, Bonito, Camucim de São Félix, Condado, Ferreiro, Goiânia, Igarassu, Itambé e São Joaquim dos Montes. Na região Sudeste foram visitados agricultores do Estado de São Paulo (SP) nos municípios de Ubatuba, Cananéia (Vale do Ribeira) e Mogi Guaçu, e na região Sul, no Estado de Santa Catarina (SC), nos municípios de Joinville e Itajaí. Na figura 2 encontra-se o mapa com os locais de coleta.

Previamente às visitas aos agricultores, foram consultados agrônomos ou técnicos das Casas da Agricultura, como da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), em Ubatuba e Santa Catarina, que deram orientações dos possíveis agricultores que cultivavam inhame. No caso das visitas realizadas nos Estados de Pernambuco e Paraíba, antes de proceder às visitas, obtiveram-se informações sobre as regiões produtoras de inhame junto a pesquisadores da UFRPE e técnicos da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), que forneceram orientações sobre possíveis agricultores. Como critério procurou-se representar as principais áreas produtoras, baseando-se em mapas da região e informação oral, obtidas na região de coleta, sobre a localização do agricultor, sendo que todas as visitas foram tomadas aleatoriamente. Foi também utilizada à metodologia “bola de neve” (BARBIE, 1991), onde algumas das indicações foram dadas pelos próprios agricultores, que conheciam e indicavam os vizinhos de sua região.

Em cada município, a coleta foi feita de modo a obter a maior representatividade da variabilidade genética por meio de caracteres morfológicos e informações dos agricultores. De cada roça, foi amostrado o máximo possível de variedades cultivadas pelo agricultor, de modo a se ter também maior número de informações sobre o nível de variabilidade dentro de roças. De cada planta amostrada, foi coletada no mínimo uma túbera semente.

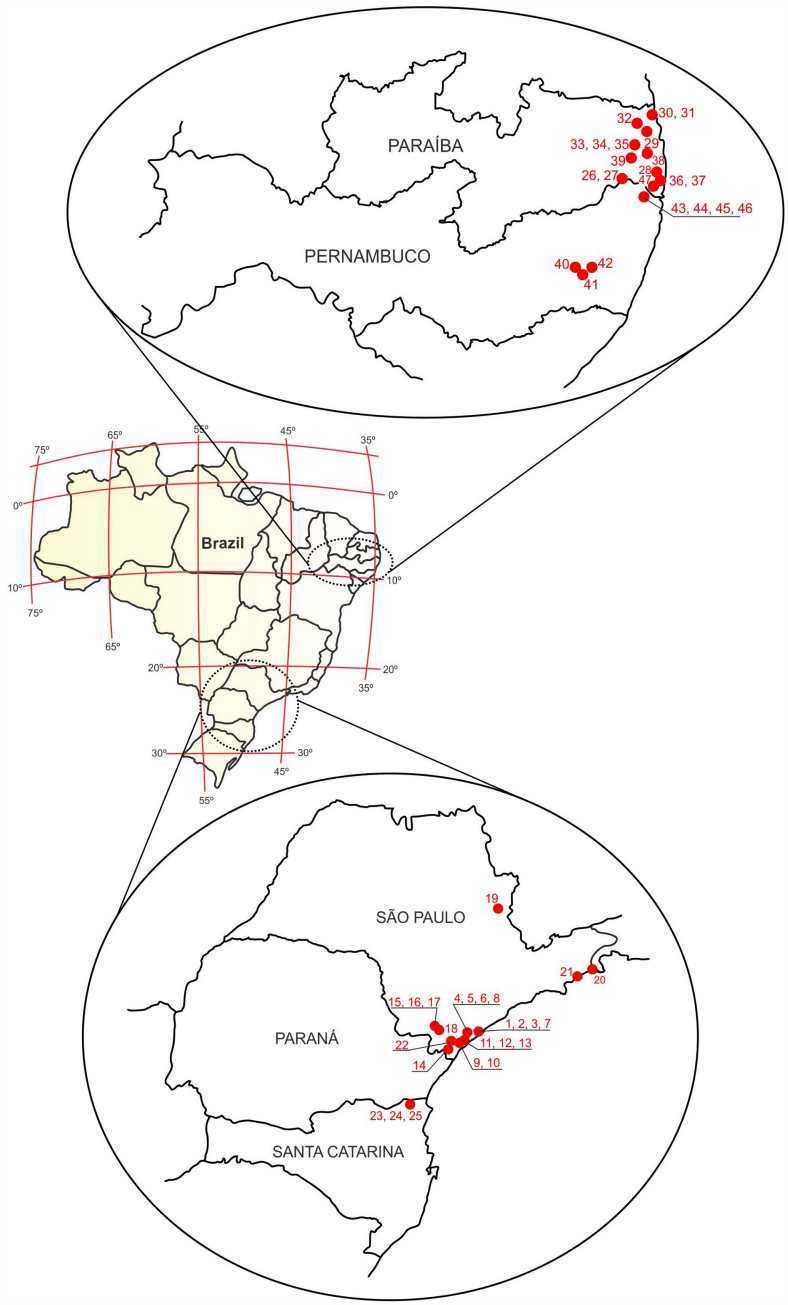

Figura 2 - Locais de coleta dos acessos do complexo *D.cayenensis/D. rotundata.* Em vermelho representa o número do acesso do banco. Mapa Elaborado por Luiz carlos Rodrigues, ESALQ/USP.

Durante as coletas foram obtidas informações etnobotânicas referentes ao manejo e uso de etnovariedades de inhame. Essas informações foram obtidas por meio de entrevistas e utilização de questionários semi-estruturados padronizados, incluindo questões para a

caracterização sócio-econômica dos agricultores envolvidos no estudo, além das questões do modo e tempo de cultivo da variedade no local, origem da variedade, nomenclatura local, se já foi observada a produção de sementes, além de características de uso apreciados pelos agricultores (ANEXO 1). Em virtude da pesquisa envolver o emprego de entrevistas com os agricultores, previamente à realização do estudo foi obtida a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (CEP - ESALQ).

3.2 Caracterização com marcadores morfológicos

Após a realização das coletas, as túberas de cada genótipo foram plantadas em vasos em casa-de-vegetação conduzida com irrigação automática no Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP. E depois introduzidas na coleção de inhame da ESALQ/USP. Dois meses após o plantio, as mudas foram transplantadas para o campo experimental em camalhões com duas repetições, com tutores para orientar o crescimento da planta. O espaçamento entre fileiras e entre plantas foi de 2,5 m e 1,5m, respectivamente.

A caracterização morfológica foi realizada em plantas individuais, ss descritores foram selecionados a partir de uma lista desenvolvida pelo International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) e International Institute of Tropical Agriculture (IITA), para as espécies do gênero *Dioscorea* (IPGRI/IITA, 1997). Foram avaliados 18 caracteres, sendo sete associados a características da folha, cinco para o caule, cinco para tubérculos e um para o florescimento (Tabela 1). Essas avaliações foram realizadas em duas etapas, sendo a primeira aos seis meses após o transplantio dos acessos no campo, pois nesta época houve disponibilidade suficiente de tecidos (folhas jovens, folhas adultas e ramos) e a segunda ocorreu durante a colheita, quando os tubérculos foram avaliados.

Tabela 1 - Caracteres utilizados para a caracterização morfológica do complexo *D. cayenensis/D. rotundata.*

Descritores	Classes fenotípicas observadas
Cor do caule	1 – verde; 2 – verde e roxa; 3 – verde e marrom; 4 – roxa.
Presença e ausência de asa no caule	1 – presente; 2 – ausente.
Presença e ausência de espinhos no caule	1 – presente; 2 – ausente.
Formato do caule	1 – poligonal; 2 – redondo
Diâmetro do caule	1 – < 0,4 cm; 2 – 0,4-0,6 cm; 3 – > 0,6 cm.
Direção do crescimento	1 – horário; 2 – anti-horário.
Posição da folha	1 – alternada; 2 – oposta.
Forma da folha	1 – cordata; 2 – sagitada.
Largura da folha	1- <6 cm; 2- 6-10 cm; 3- < 10 cm.
Florescimento	1-presença; 0- ausência.
Cor do pecíolo	1-verde; 2-roxa.
Comprimento do pecíolo	1-<5 cm; 2- 5-10 cm; <10
Distância entre o pecíolo e a extremidade superior da folha adulta	1 – < 2 cm; 2 – 2-4 cm; 3 – > 4 cm.
Tubérculo subterrâneo	1-presente; 0- ausente.
Número de tubérculo por planta	1 – um; 2 – três; 3 – mais de três.
Cor da polpa do tubérculo	1-brança; 2- amarela.

Foram utilizados caracteres qualitativos e quantitativos para a caracterização morfológica, sendo que quantitativos foram obtidos a partir da média de dez medidas para cada planta, as quais foram posteriormente inseridas em um determinado intervalo (classe de tamanho), o que permitiu a sua avaliação como dados binários (presença ou ausência de determinada classe), assim como os caracteres qualitativos.

3.3 Caracterização com marcadores microssatélites

3.3.1 Extração e quantificação de DNA total

Para a extração de DNA genômico de inhame do complexo de espécies (*Dioscorea cayenensis/D. rotundata*) foram testadas três metodologias: Doyle e Doyle (1990) com modificações usando folhas frescas (método I), Doyle e Doyle (1990) com modificações com folhas liofilizadas (método II) e Sharma et al. (2008) (método III). A metodologia escolhida por proporcionar maior quantidade e qualidade de DNA foi a de Doyle e Doyle (1990) com modificações usando folhas liofilizadas, descrita a seguir: (1) Em microtubos de 1,5 mL

identificados para cada amostra foram adicionados 30 mg do tecido macerado; (2) foram também adicionados 700 µL de tampão de extração CTAB 3% (30mM EDTA pH 8,0; 0,1M Tris-HCL pH 8,0; 1,2M NaCl, 3% CTAB, adicionando-se β-mercaptoetanol 4% imediatamente antes do uso), agitando-se os microtubos para ressuspender o tecido no tampão; (3) o material foi submetido ao banho-maria (65ºC) por 45 minutos, agitando-se os tubos manualmente a cada 15 minutos; (5) em seguida foram adicionados 500 µL de clorofil (24 partes de clorofórmio em 1 parte de álcool isoamílico); (6) o material foi centrifugado por 10 minutos à 12000 rpm; (7) o sobrenadante foi transferido para novos tubos, aos quais (8) foram adicionados 500 µL de clorofil mais 200 µL do tampão de extração CTAB 3% sem β-mercaptoetanol; (9) houve nova centrifugação por 10 minutos à 12000 rpm; (10) o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 500 µL de álcool isopropílico gelado; (11) estes foram mantidos na geladeira mais ou menos por duas horas; após este período, o material foi centrifugado durante 10 minutos a 12000 rpm; suavemente foi descartado o máximo de sobrenadante invertendo-se os tubos sem perder o pellet; (12) foram adicionados 500 µL de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, deixando-o imerso por 5 a 10 minutos, invertendo-o suavemente; (13) os tubos ficaram na bancada para secar por cerca de duas horas à temperatura ambiente; (14) cada precipitado foi ressuspendido em 200 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de 4 µL RNAse (10mg/mL); (15) o material foi submetido ao banho-maria por 30 minutos a 36-38ºC, para ser posteriormente estocado em freezer a -20ºC.

A reação de quantificação do DNA foi realizada em géis de agarose a 0,8 % (p/v), pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante Blue Green, sob UV. Essa intensidade foi comparada à de padrões com pesos moleculares e concentrações específicas e conhecidas (DNA do fago lambda). O tampão utilizado foi TBE (10X) e o tempo de corrida foi 40 minutos a 110 V. O resultado foi avaliado em um fotodocumentador.

3.3.2 Desenvolvimento de iniciadores microssatélites

A construção das bibliotecas genômicas para o desenvolvimento dos iniciadores foi realizada no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento de Plantas, sob a coordenação do professor Dr. José Baldin Pinheiro, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

Para a caracterização da variabilidade genética do complexo *D. cayenensis/D. rodundata*, foram construídas duas bibliotecas genômicas para a seleção dos fragmentos

contendo marcadores microssatélites. Inicialmente utilizou-se, ao acaso, um dos genótipos (DGC 4.0) cuja metodologia de extração de DNA e a quantificação foi mencionada no item anterior.

A construção da biblioteca genômica foi realizada utilizando o protocolo descrito por Billotte et al. (1999) com modificações, conforme descrito a seguir:

1. Digestão do DNA com enzimas de restrição – Essa etapa ocorreu para gerar fragmentos de tamanhos adequados - 5,0 µg de DNA genômico foi digerido utilizando 6,0 µL da enzima AFA (*Invitrogen* cat. 15424-013), na concentração de 0,5 U/µL, adicionando-se na reação 8,0 µL de tampão de reação, 10,0 µL de espermidina e água estéril até completar 100 µL. A digestão foi verificada após eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) por 1,5 h a 60 V, e depois disso o material foi incubado a 37°C por 16 horas.

2. Ligação dos adaptadores – O produto da digestão foi ligado aos adaptadores *AFA21* (5' CTCTTgCTTACgCgTggACTA 3') (IDT, *Integrated DNA Tchnologies, Inc*. ref. 15350710) e *AFA25* (5' pTAgTCCACgCgTAAgCAAgAgCACA 3'), a fim de garantir que todos os fragmentos tivessem uma terminação comum e conhecida. A ligação dos adaptadores foi feita utilizando 10 µM do adaptador AFA21 e AFA25, 1,0 µg do DNA genômico digerido, 10,0 µL do tampão 5X, 4,0 µL de T4 DNA ligase e água estéril para completar 40,0 µL. Esta reação foi incubada a 20°C por 2 horas.

3. Pré-Amplificação - Após a ligação, foi realizada uma etapa de pré-amplificação visando aumentar a quantidade de fragmentos que foram ligados aos adaptadores. Os fragmentos foram amplificados utilizando 3 µL do produto da ligação; 20 µM do primer *AFA21*; 5µL de tampão 10X; 2,0 mM $MgCl_2$; 200mM de dNTP e 3U de *Taq polimerase*. As reações de PCR foram feitas em termociclador (BIO-RAD My Cycler) no qual se submeteu as amostras inicialmente a 95ºC durante 4 minutos, depois a 20 ciclos de 94ºC por 30 segundos, então a 60ºC por 1 minuto e por fim a 72ºC por 2 minutos. Após os 20 ciclos, as amostras foram mantidas por 8 minutos a uma temperatura de 72ºC. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo Syber Safe, utilizando uma voltagem de 110 V por 1 hora. O *Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus* (*Fermentas Life Sciences*) foi utilizado como marcador de peso molecular.

4. Seleção dos fragmentos contendo os microssatélites - A seleção foi obtida através de *beads* magnéticas (Promega, cat. Z5481) e de sondas biotiniladas, contendo repetições em *tandem* de dinucleotídeos: biotIII$(CTT)_{10}$, biotIII$(TA)_{10}$ e biot III$(GT)_{10}$.

5. Amplificação dos fragmentos selecionados - Após a seleção dos fragmentos ricos em microssatélites, os mesmos foram amplificados via PCR, utilizando 3 µL do produto da ligação; 20 µM do primer *Rsa21*; 5µL de tampão 10 X; 2,0 mM $MgCl_2$; 200mM de dNTP e 3U de *Taq polimerase*. As reações de PCR foram realizadas em termociclador (BIO-RAD My Cycler), no qual foram submetidas as amostras inicialmente a 95ºC por 1 minuto, e depois a 25 ciclos de amplificação. A cada ciclo as amostras foram submetidas a 94ºC por 40 segundos, 60ºC por 1 minuto e finalmente a 72ºC por 2 minutos. Após os 25 ciclos, as amostras foram mantidas por 5 minutos a uma temperatura de 72ºC. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo Syber Safe, utilizando uma voltagem de 70 V por 1,5 hora. O *Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus* (*Fermentas Life Sciences*) foi utilizado como marcador de peso molecular.

6. Clonagem em vetor pGEM-T e transformação em células super-competentes - Os fragmentos amplificados foram então ligados a um vetor de clonagem *pGem – T-Vector (kit pGem-T Vector System I -Promega* cat. A3600). A ligação foi feita através de reação a 4ºC por 15 horas, contendo 10 µL de tampão, 1 µL de plasmídeo, 1 µL da enzima ligase (todos componentes fornecidos pelo *kit*) e 8 µL dos fragmentos. Células competentes de *Escherichia coli* foram utilizadas. Cem microlitros de células competentes foram adicionadas a 4 µL de fragmentos ligados ao vetor e deixadas sobre gelo durante 20 minutos. Assim as células sofreram choque térmico, sendo mergulhadas em banho-maria a 42ºC por dois minutos, sendo retiradas e colocadas no gelo por 5 minutos. Após o choque térmico, em câmara de fluxo, adicionaram-se 450 µL de meio LB (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl em água ultrapura, com pH igual a 7,0) autoclavado e pré-aquecido a 37ºC. Em seguida, as células foram deixadas em estufa a 37ºC por 50 minutos. Após a incubação, o tubo contendo as células foi centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm, e 350 µL do sobrenadante foram descartados. O volume restante de 60 µL, incluindo o *pellet*, foi aliquotado sobre placa de Petri contendo meio LB sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de *Select Agar* em água ultrapura, com pH igual a 7,0) contendo 100 µg/ml de ampicilina. Também aliquotou-se na placa de Petri 60 µL de 20% p/v IPTG e 60 µL de 2% p/v X-GAL. As placas de Petri foram deixadas em estufa a 37ºC por 15 horas. Depois do tempo de crescimento das colônias, as de coloração branca foram repicadas em poços de microplaca do tipo ELISA (*Costar*, cat. 3795) contendo 140 µL de meio 2YT-HMFM (1,6% p/v de triptona, 1% p/v de extrato de levedura, 0,5% p/v de NaCl, 0,0076% p/v de MgSO4 (7H2O), 0,045% p/v de Citrato de Sódio, 0,09% p/v de (NH4)2SO4, 4,4% p/v de glicerol, 0,18% p/v de KH2PO4 e 0,47% p/v de K2HPO4 em água ultrapura)

acrescido de 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram mantidas em estufa a 37ºC por 15 horas, fechadas com adesivo selador (AB-Gene, cat. AB0558) e transferidas para freezer -20ºC.

7. Amplificação dos clones - Realizou-se então uma reação de PCR para verificar se os clones transformados apresentavam os insertos. A reação foi feita conforme reação: 3 µL do produto da ligação; 20 µM do primer *Rsa21*; 5µL de tampão 10 X; 2,0 mM $MgCl_2$; 400mM de dNTP; 3U de *Taq polimerase*. A reação de PCR foi feita inicialmente a 95ºC por 4 minutos, com 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo foi de 94ºC por 30 segundos, 52ºC por 45 segundos e finalmente a 72ºC por 1,5 minutos. Após os 30 ciclos, as amostras foram mantidas por 8 minutos a uma temperatura de 72ºC. Após a amplificação os fragmentos serão separados em gel de agarose 1,5%. Os clones transformados foram mantidos a -80ºC.

Após a seleção dos fragmentos contendo clones positivos para SSR foram extraídos os plasmídeos e depois seqüenciados em seqüenciador automático. Foi realizada uma reação com 1µg do plasmídeo, 2 µL do Mix *Bid Dye* (Applied Biosystem) e água MilliQ para completar 20 µL. As placas contendo os plasmídeos extraídos foram congeladas a -20ºC.

Antes do sequenciamento foi realizada ainda uma etapa de purificação. A cada poço da placa foram adicionados 80µL de 65% (v/v) de isopropanol. Imediatamente antes do sequenciamento as amostras foram desnaturadas em termociclador, a 90ºC por três minutos, e depois imediatamente colocadas sobre gelo por cinco minutos. A reação de sequenciamento foi preparada em água ultrapura autoclavada com 4 µL de plasmídeo, 0,5 µM de *primer* SP6, 2 µL de *Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) e 2 µL de tampão *Save Money* (preparado com 10% (v/v) de $MgCl_2$, 50 mM e 20% (v/v) de Tris HCl pH 9,0 em água ultrapura autoclavada). O sequenciamento foi realizado no Centro de Citricultura do Instituto Agronômico em Cordeirópolis. Utilizou-se o sequenciador *3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems) e as sequências obtidas foram processadas pelo *3730/3730xl Data Collection Software v3.0* (*Applied Biosystems*).

As sequências obtidas foram transformadas em formato "FASTA" pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor e depois foram retirados os trechos relativos ao vetor e ao adaptador.

O programa Webtroll (disponível em http://wsmartins.net/webtroll/troll.html) permitiu a identificação de microssatélites nas seqüências obtidas. Os parâmetros utilizados para a identificação de microssatélites foram os seguintes: microssatélites compostos por motivos dinucleotídeos devem ter no mínimo sete repetições do motivo, microssatélites compostos por

motivos trinucleotídeos devem ter no mínimo cinco repetições do motivo e microssatélites compostos por motivos tetranucleotídeos (ou mais) deveriam ter no mínimo três repetições do motivo.

O programa primer 3 (disponível em http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) foi utilizado para o desenho dos pares de iniciadores que flanqueiam os microssatélites. Os parâmetros foram configurados para obtenção de iniciadores cujo produto final da amplificação esteja no intervalo de 150 a 250 pb, que é um tamanho compatível com a eletroforese em géis de poliacrilamida 7% corados com nitrato de prata; o tamanho dos iniciadores deve estar entre 18 e 22 pb e a porcentagem de GC deve estar no intervalo de no mínimo 50% e máximo 60%; a diferença de temperatura de anelamento dos iniciadores deve variar entre 55 e 70°C; e a diferença na temperatura de anelamento entre os pares de iniciadores deve variar no máximo em 3°C.

O software Gene Runner v. 3.1, além de confirmar os valores para cada um dos parâmetros acima citados, também acusa a formação de estruturas secundárias, que são indesejáveis se ocorrerem em temperaturas próximas das temperaturas da reação de PCR. Desta maneira, foi possível avaliar a qualidade de cada par de iniciadores obtido, selecionando os mais adequados para as reações de PCR.

O software Chromas 2 foi utilizado para avaliar a qualidade do sequenciamento nas regiões dos iniciadores e dos microssatélites.

3.3.3 Caracterização e genotipagem dos microssatélites

As análises de microssatélites foram realizadas no Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada, - LEEGA, coordenado pela professora Dra Elizabeth Ann Veasey do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

Foram testados onze iniciadores específicos para o complexo *Dioscorea cayenensis*/*D. rodundata* resultante da biblioteca enriquecida e um iniciador heterólogo (Dpr3F12) de Tostain et al (2006).

Para cada iniciador, foram testadas quatro concentrações de $MgCl_2$ (5mM; 2,5mM; 2mM e 1,5mM) com a finalidade de melhorar a qualidade da visualização dos produtos da amplificação. Para isso, nas reações de PCR, foram utilizadas 1,0 µL de $MgCl_2$ de soluções de trabalho com quatro concentrações diferentes, sendo estas: 50 mM, 25 mM, 20 mM e 15 mM de $MgCl_2$.

Considerando o tempo necessário para a otimização e existindo a possibilidade de outra metodologia para a amplificação dos fragmentos, sem a necessidade de determinar qual a melhor temperatura, optou-se por um teste composto de cinco indivíduos, utilizando o programa *Touchdown*, onde é feita uma pré-amplificação de fragmentos com a temperatura diminuindo 1ºC a cada ciclo. Foram testados dois esquemas de *Touchdown*. Um com a temperatura de anelamento variando de 50ºC a 60ºC e outro com a temperatura de anelamento variando de 55ºC a 45ºC. As fases seguintes deste programa seguem normalmente as fases que compõe uma reação de PCR comum.

Para proceder as reações de amplificação foi utilizado o termociclador modelo MyCycler Thermal Cycler da BioRad, utilizando as seguintes etapas: uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 94ºC, seguida de 10 ciclos de pré-amplificação [30 segundos a 95ºC, 30 segundos na temperatura inicial de anelamento de 60ºC ou 55ºC, diminuindo 1ºC a cada ciclo, 50 segundos a 72ºC], depois 30 ciclos de desnaturação [30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 50ºC, 50 segundos a 72ºC], e uma fase final de extensão de 5 minutos a 72ºC.

A reação de amplificação foi realizada num volume final de 16 µL contendo a seguinte mistura de soluções [0,08 µL de *Taq-Polimerase* (5 U/µl); 3,2 µL de Tampão (5X); 1,6 µL $MgCl_2$ (25mM); 0,48 µL de iniciador F (10 pmoles/µL); 0,48 µL de iniciador R (10 pmoles/µL); 1,6 µL de dNTP (2 mM de cada); 4,56 µL de H_2O Milli-Q e 4 µL de DNA (5 ng/µL) em cada tubo], que fornece os reagentes necessários para a reação.

O material amplificado foi submetido à eletroforese utilizando sistema desnaturante em géis de poliacrilamida a 7% (70 mL acrilamida 7%, 100 mL de TBE 10X, 420 g de uréia, além de 280 µL de persulfato de amônio a 10% e 118 µL de TEMED). Foram utilizadas cubas verticais de eletroforese com placas de capacidade para 60 amostras em gel de 0,7 mm de espessura. Os géis foram pré-aquecidos por 40 min a 70 W de potência constante. Foram aplicadas 6µL das amostras previamente desnaturadas com 2µL de tampão de carregamento (95% formamida, 0,05% de xylenicyanol; 0,05% de azul de bromofenol e 12,5% de sacarose) a 95ºC por 5 min. A eletroforese para a corrida dos fragmentos foi realizada a potência inicialmente de 50 W durante por 10 minutos e depois 60 W em média de 3 horas e meia. Utilizou-se como marcador de peso molecular, DNA *ladder* de 10pb e de 100pb da Invitrogen. Os géis foram corados com nitrato de prata (Creste et al., 2001), e fotografados com máquina digital para arquivo e as bandas de microssatélites resultantes foram avaliadas em transluminador de luz branca logo após o término da revelação.

3.4 Análises estatísticas

Para a análise dos dados etnobotânicos e sócio-culturais dos agricultores, obtidos durante a coleta do material genético, foi utilizado o método de estatística descritiva.

Para os dados morfológicos, os mesmos foram avaliados como dados binários (presença ou ausência de determinada classe fenotípica), tanto para os caracteres qualitativos, como para os quantitativos. Por exemplo, para presença ou ausência de espinhos no caule, os acessos com espinhos receberam número '1' (presença) e os sem espinhos receberam número '0' (ausência). Para os caracteres quantitativos, e para comprimento do pecíolo, por exemplo, na classe < 5cm os acessos com pecíolos < 5cm receberam '1' (presença) e os demais '0' (ausência desta classe).

Por tratar-se de materiais poliplóides (BOUSALEM et al., 2006), as bandas de microssatélites foram avaliadas como presença/ausência de bandas, como se fossem marcadores dominantes, apesar dos SSR serem marcadores co-dominantes. Em indivíduos poliplóides não é possível verificar a freqüência alélica, mas sim somente a freqüência de marcas. Porém, deste modo foram também calculados os níveis de polimorfismo (número de bandas polimórficas/número total de bandas). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), proposto por Botstein et al. (1980) é possível de ser utilizado para dados binários. O PIC foi calculado pela fórmula: $PIC = 1 - \sum_{i-1}^{n} p_i^2$ onde: p_i = freqüência do alelo (banda) em cada loco e n = número de alelos observados. Também foi calculada a heterozigosidade esperada.

O índice de Shannon (também chamado de índice Shannon-Weaver ou de índice do Shannon-Wiener) *H'* é um dos diversos índices da diversidade usados para medir a diversidade em dados categóricos (YEH et al., 1997). Para o cálculo desse índice usou-se a seguinte fórmula:

$$H' = \sum_{i=1}^{s} \left(p_i \cdot \log p_i \right) \qquad (1)$$

Os dados binários, tanto morfológicos como os marcadores microssatélites, foram utilizados para a obtenção dos coeficientes de similaridade de Jaccard. As matrizes de similaridade foram em seguida submetidas às análises de coordenadas principais, utilizando o programa PAST (HAMMER et al., 2001), e às análises de agrupamento, utilizando o algoritmo Unweighted Neighbor-Joining, pelo software DARwin v.5.0 (PERRIER et al., 2003). Outro parâmetro analisado foi a correlação entre matrizes de distâncias genéticas (obtidas tanto com os descritores morfológicos como com os marcadores microssatélites) e

distância geográfica, e correlação entre matrizes de distâncias genéticas entre os marcadores morfológicos e moleculares, pela correlação de Pearson (r), cuja significância foi avaliada pelo teste de Mantel (1967), utilizando o software NTSYS-pc (ROHLP, 1992).

Para a verificação da estrutura genética das etnovariedades amostradas junto a agricultores tradicionais, foi também realizada a análise de variância molecular (AMOVA) para a discriminação da partição da variabilidade observada nos diferentes níveis amostrados. Ou seja, para verificar se esta é encontrada em maior proporção entre ou dentro de regiões geográficas amostradas, e também entre ou dentro de espécies, considerando-se as duas espécies separadamente (*D. cayenensis* e *D. rotundata*), uma vez que o estudo mostrou a separação entre ambas, utilizando para tanto o programa Arlequin (SCHNEIDER et al., 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Coleta do material genético

O complexo *Dioscorea cayenensis/D. rodundata* foi observado sob cultivo em todas as regiões visitadas. A região Nordeste mostrou-se a principal região de cultivo desse complexo, com cerca de 60% do material coletado nesta região.

A fim de traçar o perfil sócio-econômico dos agricultores que cultivam inhame, foram analisadas as entrevistas realizadas com os agricultores nos locais visitados. Observou-se que a média etária foi de 53,32 anos ($23 \leq n \leq 83$), em que a maioria dos entrevistados eram homens (89%) em comparação com 11% de mulheres. A grande maioria (78%) dos agricultores residia no local há mais de 20 anos, sendo que 45% moravam no mesmo local onde nasceram. Verifica-se, portanto, neste estudo baixa mobilidade geográfica, o que pode ter influenciado na origem do material cultivado, nas relações de trocas de variedades entre agricultores e nos modos de transmissão dos conhecimentos. As unidades familiares apresentaram, em média, quatro filhos, variando de 0 a 19.

Com relação à situação fundiária, 45% declararam que são proprietários do local que usam para cultivo, enquanto 39% afirmaram ser posseiros, e em 16% dos casos configuram-se relações de uso ligadas as atividades como “caseiro” e “emprestado”.

Entre os agricultores entrevistados, 32% relataram que a principal fonte de renda da família é originada principalmente da agricultura, sendo que a renda previdenciária é considerada como fonte principal para 59% dos agricultores que também praticam a agricultura, enquanto que 28% dos agricultores dependem de outras fontes de renda para sua sobrevivência. Observa-se que a renda previdenciária é muito importante para grande parte das unidades familiares. Como a média etária é intermediária (53 anos), é esperado que este tipo de recurso seja importante. Porém, mesmo em unidades familiares onde os filhos são parte da força de trabalho familiar, este recurso acaba sendo a fonte principal de renda. Observa-se também que a mão de obra disponível para as atividades produtivas das unidades familiares não é numerosa. Para o conjunto de agricultores entrevistados, 75% dependem de familiares, 18% utilizam ambos familiares e não familiares, e apenas 7% utilizam mão de obra contratada.

O cultivo de inhame (*Dioscorea cayenensis/D.rotundata*) é realizado em 75% dos casos em roças com menos de 2 ha, sendo seu plantio consorciado com outras espécies, na maioria das vezes. Observa-se que o espaço da roça é de fundamental importância para a conservação da agrobiodiversidade, principalmente para as comunidades locais. Observou-se

também que 11% dos entrevistados utilizam área de cultivo acima de 2 ha, caracterizando área com fins de comercialização de larga escala, como é o caso de alguns agricultores da região Nordeste do seguintes municípios: Bonito-PE (10 ha), Alhandra-PB (20 ha), São Joaquim dos Montes-PE (30 ha) e Camucim de São Félix-PE (5 ha).

Em relação ao modo de colheita, foi verificado que em 70% das comunidades da região Nordeste, a colheita é realizada em duas fases: 1) Colheita das túberas para o ”beneficiamento ou capação”- onde se destaca uma parte da túbera, permanecendo na planta a parte que, inicialmente, a produziu e onde, também, tiveram origem o caule e as raízes. Essa posteriormente emite novas raízes e pela continuação do processo, vão constituir novas túberas, agora, em grande número e de menor tamanho; 2) Numa segunda fase, essas novas túberas permitem a realização de uma segunda colheita, que constitui a produção de “túberas-semente”, uma termologia usada pelos agricultores para os tubérculos empregados no plantio, desde que a umidade necessária para a vegetação da planta se prolongue por cerca de 60 dias.

De acordo com o questionário, cerca de 48% cultivam mais de uma variedade de inhame. Na Tabela 2 encontram-se os principais nomes vernaculares que os agricultores mencionaram. A variedade “inhame da costa” foi a mais citada, com 47% das unidades amostrais, seguido do “inhame de Pernambuco”, com 18%, sendo que Pernambuco e Paraíba são os Estados que apresentaram maior frequência dessas variedades, respectivamente. Este fato é explicado principalmente porque essas variedades apresentam maior adaptação às condições edafoclimáticas locais, resistência a doenças e boa aceitação comercial entre os produtores e consumidores da região. Já nos Estados de São Paulo e Santa Catarina, as variedades deste complexo de espécies são denominadas principalmente de “cará de espinho”.

Em relação à origem dessas variedades, 58% dos agricultores declararam ter adquirido as túberas-semente entre amigos, vizinhos, parentes ou em feiras livres do próprio município; 20% adquiriram em outro município localizado no mesmo Estado e 12% afirmaram cultivar túberas provenientes de outros Estados. Isso ocorre para ampliar o número de mudas de uma variedade já existente, como para experimentar novidades. E somente 10% admitiram nunca ter comprado túberas-semente, sendo o plantio realizado com as túberas derivadas de materiais adquiridos há algum tempo e que foram repassados de geração a geração. Esses resultados reforçam que ocorrem pouca mobilidade das pessoas, e mostram que havendo trocas, essas se dá ocorrido no âmbito regional, mas com amplitude limitada.

Tabela 2 - Nomes vernaculares, freqüência de citações e número de agricultores por Estado para variedades de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis/D. rotuundata.*

Variedades	(%)	PE	PB	SP	SC
Inhame da Costa	47	13	7	1	-
Inhame de Pernambuco	18	1	7	-	-
Cará de espinho	18	-	-	4	4
Inhame original	9	2	2	-	-
Inhame japecanga	7	-	3	-	-
Inhame	7	-	3	-	-
Inhame cará babão	2	-	1	-	-
Inhame da rama verde	2	-	1	-	-
Inhame da folha larga	2	1	-	-	-
Inhame folha cacheada	2	1	-	-	-
Cará espinhento	2	-	-	1	-

Quando contabilizado o tempo de origem das variedades de inhame, 68% não souberam responder, havendo resposta do tipo: “quando nasci já existia na família...”, “já tinha quando eu cheguei aqui...”, “há muito tempo, é do local, sempre existiu por aqui”.

Cerca de 70% dos agricultores plantam mais de uma variedade de inhame. Segundo os entrevistados este procedimento dá maior garantia de colheita, pois caso algum fator biótico ou abiótico venha ocorrer no local de forma desfavorável para a cultura dificilmente atingiriam as variedades numa mesma intensidade, aumentando assim a probabilidade de se obter produção suficiente que garanta ao menos o sustento da família durante certo período. Do total dos agricultores, 42% afirmaram já ter plantado variedade de inhame que hoje não planta mais, e os principais motivos para tal abandono relacionado pelos entrevistados foram mudanças ocorridas nas condições físico-químicas do solo, diminuição de mão de obra e má distribuição de terra. Sendo essas também as principais causas de perda de etnovariedades de inhame. Daí a importância de se conhecer e preservar a agrobiodiversidade mantida pelos sistemas agrícolas tradicionais.

Segundo o levantamento realizado, 42% dos agricultores afirmaram ter diminuído sua área de cultivo de inhame devido ao aumento do custo de produção, falta de mão obra e, principalmente, falta de informações relacionadas ao manejo adequado da cultura, e meios de controle de doenças e pragas.

Em relação aos processos reprodutivos sexuados, observou-se que cerca de 65% dos entrevistados já verificaram algo parecido com a floração, onde após algum tempo as inflorescências em forma de cacho secam. Este momento indica o momento ideal para a colheita das túberas para o beneficiamento. Quanto à frutificação, este processo não foi

observado por nenhum dos entrevistados e sobre o modo de propagação da cultura utilizado, todos os agricultores afirmaram ser de propagação vegetativa, via tubérculo.

4.2 Caracterização com marcadores morfológicos

Foram utilizadas nesse estudo 48 etnovariedades, sendo que 17 já existiam na coleção de germoplasma de inhame da ESALQ/USP, referente a coletas anteriores no Vale do Ribeira/SP (Tabela 1).

Tabela 3 - Relação dos acessos de *D. cayenensis/D. rotundata* utilizados nesse estudo, número de identificação dos acessos mantidos no banco de germoplasma do Departamento de Genética (DGC), município, comunidade de coleta, nome popular e coordenadas geográficas.

(continuação)

Nº	DGC	Município	Comunidade	Nome popular	Lat. (S)	Long. (O)
1	4	Iguape/SP	Icapara	cará de espinho	24º40'	47º27’
2	6	Iguape/SP	Praia do Leste	cará de espinho	24º40'	47º27’
3	9	Iguape/SP	Icapara	cará são João roxo	24º40'	47º27’
4	13	Iguape/SP	Momuna	cará de espinho	24º42’	47º40’
5	17	Iguape/SP	Momuna	cará de espinho	24º42’	47º40’
6	21	Iguape/SP	Momuna	cará guaçu	24º42’	47º40’
7	33	Iguape/SP	Perupava	cará de espinho	24º40'	47º27’
8	327	Iguapé-SP	Momuna	Cará de espinho	24º42’	47º40’
9	56	Cananéia/SP	São Paulo	Cará de espinho	24º 57'	47º 53'
10	57	Cananéia/SP	São Paulo	Cará d'angola	24º 57'	47º 53'
11	69	Cananéia/SP	Rio Branco	Cará de espinho	24º 54'	48º 02'
12	72	Cananéia/SP	Ex-colônia	Cará de espinho	24º 52'	48º00'
13	76	Cananéia/SP	Palmeiras	Cará de espinho	24º 54'	48º 01'
14	86	Cananéia/SP	Santa Maria	Cará d'angola	25º 04'	48º 08'
15	90	Iporanga/SP	Nhunguara	Cará de espinho	24º 34'	48º 24'
16	98	Iporanga/SP	Ribeirão	Cará d'angola	24º 34'	48º 24'
17	117	Iporanga/SP	-	Cará de espinho	24º 34'	48º 24'
18	96	Eldorado/SP	Sapatu	Cará de espinho	24º 35'	48º 20'
19	310	MogiGuaçú/SP	Bairro Itaquí	Inhame da costa	22º10’	47º00’

Tabela 3 - Relação dos acessos de *D. cayenensis/D. rotundata* utilizados nesse estudo, número de identificação dos acessos mantidos no banco de germoplasma do Departamento de Genética (DGC), município, comunidade de coleta, nome popular e coordenadas geográficas

(conclusão)

Nº	DGC	Município	Comunidade	Nome popular	Lat. (S)	Long. (O)
20	209	Ubatuba/SP	-	Cará de espinho/Japeira	23º22'	44º46'
21	200	Ubatuba/SP	Sertão do Ingá	Cará espinhento	23º31'	45º14'
22	322	Ilha	Pedrinhas	Cará de espinho	24º 53’	47º47’
23	294	Joinville-SC	Pirabeiraba	Cará de espinho	26º 09’	48º59’
24	288	Joinville-SC	Pirabeiraba	Cará de espinho	26º 09’	48º59’
25	300	Itajaí-SC	Laranjeiras	Cará de espinho	26º 58’	48º48’
26	147	Alhandra/PB	Jussara	Inhame da Costa	07º25'	34º53'
27	272	Alhandra/PB	Jaquarema	Inhame da costa	07º21'	34º37'
28	257	Alhandra/PB	Sitío Canaã	Inhame da costa	07º23'	34º55'
29	148	Rio Tinto/PB	Boa Vista	Inhame de Pernambuco	06º51'	35º04'
30	154	Marcação/PB	Lagoa Grande	Inhame de Pernambuco	06º46'	35º01'
31	155	Marcação/PB	Aldeia Três	Inhame de Pernambuco	06º46'	35º00'
32	156	Marcação/PB	Aldeia Três	Inhame Japecanga	06º46'	35º10'
33	160	Sapé/PB	Melância	Inhame de Pernambuco	07º01'	35º11'
34	178	Sapé/PE	Feira livre	Inhame branco	07º01'	35º11'
35	269	Sapé/PB	Sítio Boa Vista	Inhame de Pernambuco	07º06'	35º11'
36	262	Caaporã/PB	Capim de Cheiro	Inhame da costa	07º30'	34º57'
37	251	Caaporã/PB	Capim de	Inhame da costa	07º30'	34º57'
38	261	Santa Rita/PB	Fazenda Socorro	Inhame original ou Japeganga	07º07'	35º02'
39	268	Sobrado/PB	Anta do	Inhame	07º10'	35º13'
40	164	São Joaquim do Monte/PE	Sítio Tamanduá	Inhame da Costa	08º26'	35º47'
41	166	Bonito/PE	Colônia de Japoneses	Inhame da Costa	08º29'	35º42'
42	271	Bonito/PE	Santa Alice	Inhame original/seda	08º26'	35º36'
43	246	Goiana/PE	Engenho	Inhame da Costa	07º35'	35º03'
44	248	Goiana/PE	Av. Liberdade	Inhame	07º32'	34º03'
45	249	Aliança/PE	Sítio Laranjeira	Inhame da Costa	07º36’	35º08'
46	260	Aliança/PE	Boa Vista	Inhame da costa	07º36'	35º14'
47	252	Ferreiro/PE	Sítio Araçá	Inhame da folha larga	07º28'	35º16'
48	331	Recife/PE	Feira livre	-	-	-

A partir da caracterização morfológica observou-se que 100% das variedades coletadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, apresentaram cor verde do caule, ausência de asas na haste, presença de espinhos no caule, caule redondo, direção de crescimento no

sentido anti-horário, hábito trepador, cor do pecíolo verde e presença de tubérculos subterrâneos. Com relação aos demais caracteres avaliados, a grande maioria (98%) apresentou caule com diâmetro > 06 cm. Quanto à posição da folha, 67% apresentaram folhas opostas enquanto que o restante (33%) apresentou folhas alternadas. Para a forma da folha, que foi um dos caracteres mais importantes na separação visual das duas espécies, observou-se 52% de folhas ovaladas, típicas de *D. rotundata*, e 48% de folhas orbiculadas, típicas de *D. cayenensis*, segundo Martin (1978).

Com relação ao comprimento do pecíolo, 56% apresentaram pecíolo > 5cm, enquanto o restante (44%) apresentou pecíolo de 5 a 10cm. Com relação à distância entre o pecíolo e a extremidade superior da folha adulta, a maior parte (81%) apresentou distância < 10cm, sendo que 8% apresentaram distância de 10 a 15cm, e 11% distância > 15cm. Com relação à largura da folha, 40% apresentaram folhas com largura < 6cm, 42% folhas de 6 a 10cm, e o restante (18%) folhas com largura > 10cm.

A forma do tubérculo variou de alongado (54%), irregular (38%) e arredondado (8%). A maior parte dos tubérculos apresentou casca de cor marrom (77%), seguido de casca amarela (23%). A cor da polpa variou de branca (52%), amarela (46%) e amarela e roxa (2%), com apenas um indivíduo nesta categoria. A cor da polpa foi outra característica importante para a separação dos acessos, considerando que a cor amarela é típica da espécie *D. cayenensis* e a cor branca da espécie *D. rotundata*, conforme Martin (1978), e conforme as observações realizadas no presente estudo. Com relação ao número de tubérculos produzido por cada variedade, 58% produziram um tubérculo apenas, enquanto que 42% produziram alguns, variando de dois a cinco tubérculos. Considerando-se o tamanho grande dos tubérculos, em comparação com outras espécies, pode-se entender o porque da produção de apenas um tubérculo pela maioria das variedades.

Com relação ao florescimento, apenas 17% das variedades floresceram, sendo que não foi observada formação de sementes para nenhuma destas que floresceram. Dentre os 17% (oito variedades), todas, exceto uma delas, foram classificadas, de acordo com a cor do tubérculo e a forma da folha, como *D. rotundata.*

Na análise de coordenadas principais (Figura 3) observou-se a formação de grupos consistentes entre os acessos por região. Para a coordenada principal 1, observou-se que os acessos da região Nordeste agruparam-se à esquerda desta coordenada, enquanto que os acessos da região Sudeste agruparam-se à direita da mesma. Já para os acessos da região Sul, um deles (nº 24) mostrou-se em posição intermediária aos dois grupos, enquanto que o segundo (nº 25) situou-se no grupo da região Sudeste. No dendrograma apresentado na

Figura 4, observou-se, da mesma forma, a divisão dos acessos em dois grupos de acordo com a região amostrada, com a separação nítida dos acessos do Sudeste e do Nordeste. Entre os acessos da região Sul, observou-se que um deles (nº 24) situou-se numa posição intermediária, enquanto que os outros dois mostraram-se semelhantes a ambos os grupos, ou seja, o acesso nº 25 mostrou-se agrupado junto aos acessos do Sudeste, enquanto que o nº 23 mostrou-se agrupado junto aos acessos do Nordeste. Verificou-se, em seguida, que os acessos do Sudeste referem-se aos tipos morfológicos equivalentes à espécie *D. cayenensis*, enquanto que os do Nordeste referem-se aos tipos morfológicos relativos à espécie *D. rotundata.*

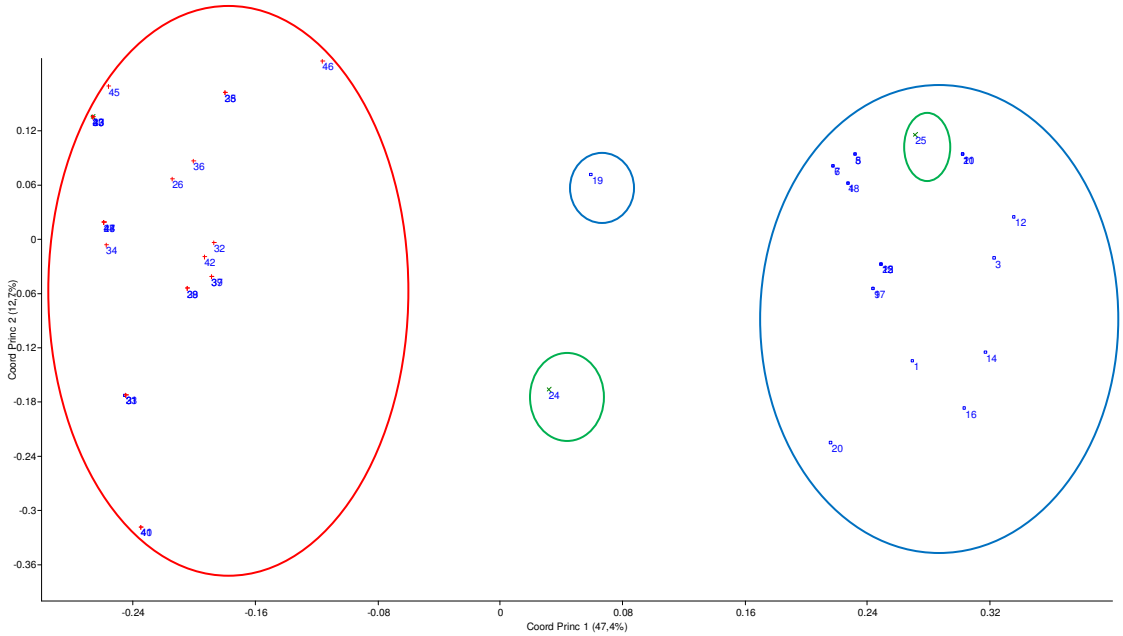

Figura 3 - Gráfico de dispersão para a análise de coordenadas principais utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard para 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata*, de três regiões: Sudeste (azul), Sul (verde) e Nordeste (vermelho), avaliados com marcadores morfológicos

Na Tabela 4 realizou-se a AMOVA por região de estudo e verificou-se que a maior parte da variabilidade (54,8%; P<0,01), encontra-se entre regiões, embora seja também expressiva a porcentagem da variação total atribuída à variação dentro de regiões (45,24%). Verificou-se neste estudo, de maneira até surpreendente, que os acessos identificados, via caracteres morfológicos, como pertencendo à espécie *D. cayenensis*, ou seja, com tubérculos amarelos e folhas orbiculadas, se originaram preferencialmente das regiões sul e sudeste, e por outro lado, os acessos identificados como *D. rotundata*, com tubérculos brancos e folhas ovaladas, se originaram da região do Nordeste, com poucas exceções. Portanto, pode-se inferir que grande parte desta diferenciação entre regiões observada na AMOVA e em ambos

os gráficos de dispersão e no dendrograma, deve-se à própria diferenciação entre ambas as espécies.

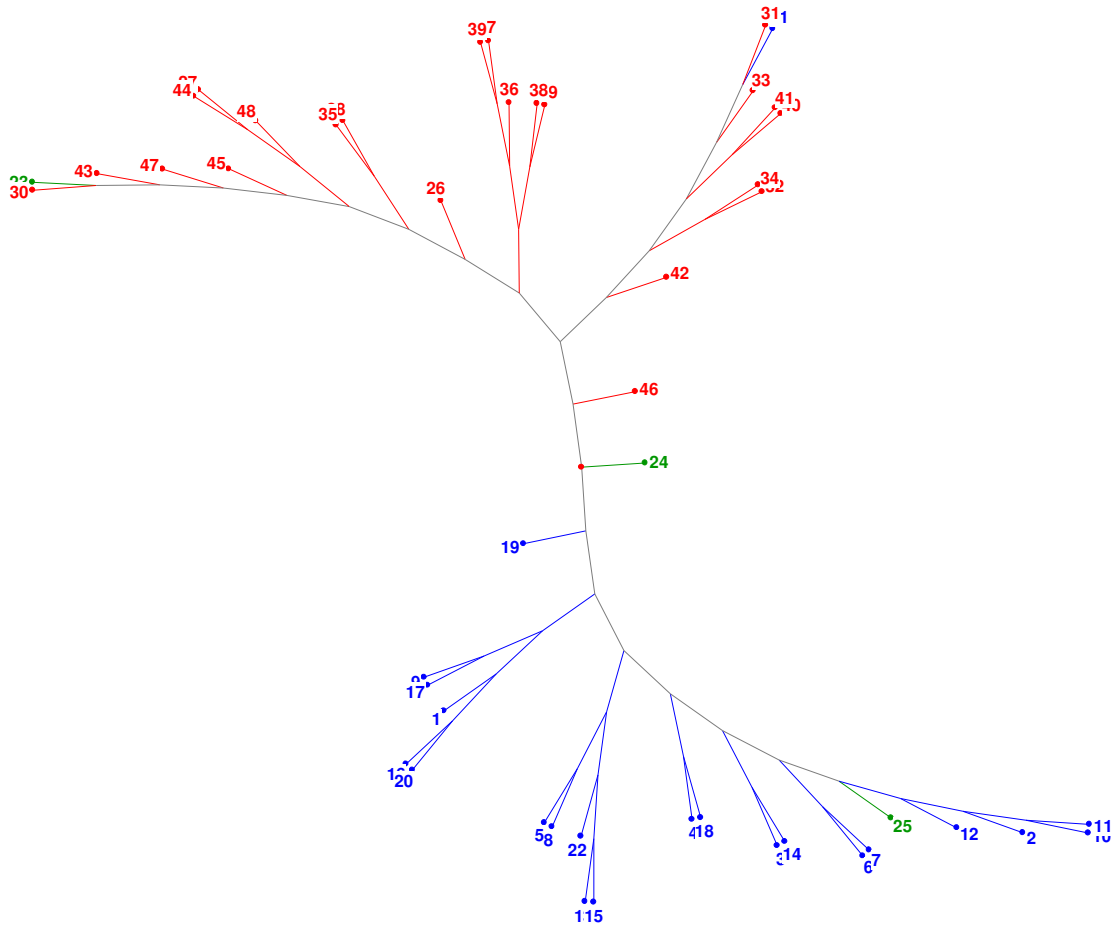

Figura 4 - Dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e método agromerativo de Neighbor-Joining para 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata*, de três regiões: Sudeste (azul), Sul (verde) e Nordeste (vermelho), avaliados com marcadores morfológicos

Tabela 4 - Análise de variação molecular (AMOVA) para 48 acessos de inhame (*Dioscorea cayenensis/ D. rotundata*) originários de três regiões do Brasil: sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo) e nordeste (Pernambuco e Paraíba), avaliados com 18 caracteres morfológicos

Fonte de Variação	G.L	SQ	% da variação total	Valor de P[1]
Entre regiões	2	95,348	54,76	0,0000
Dentro de regiões	45	126,110	45,24	-
Total	47	221,458	-	-

[1]Número de permutações = 1023

Para confirmar esta hipótese, novas análises de variância molecular (AMOVA) foram realizadas considerando-se as duas espécies separadamente (Tabela 5), retirando-se desta análise um acesso cuja identificação estava duvidosa (originário de Mogi Guaçu, SP). Esta nova análise mostrou que a maior parte da variabilidade foi atribuída à variação entre as espécies (60,8%; P<0,01). No entanto, uma parcela ainda significativa (39,1%), foi atribuída à variação dentro de espécies, mostrando que além da diversidade entre ambas as espécies, há também diversidade dentro de cada uma das espécies.

Tabela 5 - Análise de variação molecular (AMOVA) para 22 acessos da espécie *Dioscorea cayenensis* e 26 acessos de *D. rotundata*, originários de três regiões do Brasil: sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo) e nordeste (Pernambuco e Paraíba), avaliados com 18 caracteres morfológicos

Fonte de Variação	G.L	SQ	% da variação total	Valor de *P*[1]
Entre espécies	1	98,468	60,85	0,0000
Dentro de espécies	44	119,405	39,15	-
Total	45	217,872	-	-

[1]Número de permutações = 1023

4.3 Caracterização com marcadores microssatélites

4.3.1 Extração e quantificação de DNA total

O método II foi que apresentou melhores resultados quanto à quantidade de DNA (Figura 1).

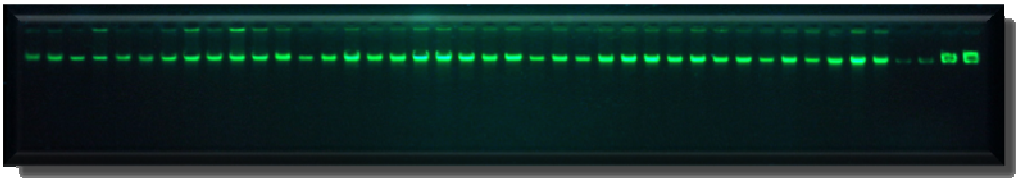

Figura 5 - Gel de quantificação em agarose a 0,8% (p/v) corado com corante Sybr Green e comparada a padrões com pesos moleculares e concentrações específicas (DNA do fago) com a metodologia Doyle e Doyle (1990) com folhas liofilizadas

Embora o método II tenha sido mais eficiente na quantidade de DNA extraído, não houve diferença quanto a qualidade do DNA entre este e o método I no que tange a obtenção

de DNA amplificado. O método II foi o mais apropriado para o estudo, pois este viabilizou a obtenção e armazenamento de materiais vegetais para o trabalho, visto que no método Doyle e Doyle (1990) com folhas liofilizadas, não há a preocupação de manter folhas frescas.

4.3.2 Desenvolvimento de iniciadores de microssatélites

A construção da primeira biblioteca resultou em 180 clones, dos quais 70 foram enviados ao seqüenciamento. Destes, foram detectados somente dez clones contendo pelo menos um microssatélite, o que representa um enriquecimento da biblioteca de 14%. No entanto, mais de 50% dos clones enriquecidos apresentaram qualidade de seqüenciamento ruim, visualizada pela observação de picos múltiplos nos eletroforegramas no programa Chromas v.2.33. No total resultou-se somente em dois pares de iniciadores, um dinucleotídeo $(TC)_9$ e o outro tetranucleotído $(AAAC)_4$, ambos do tipo microssatélites perfeitos.

Uma nova biblioteca foi construída para a continuação dos estudos para a obtenção de mais marcadores. O enriquecimento foi realizado com base na biblioteca anterior, resultando em 150 insertos seqüenciados. Destes, foram obtidos 18 clones contendo pelo menos um microssatélite, o que representa um enriquecimento da biblioteca de 12%, sendo que o total foi 23 motivos microssatélites. Foram encontrados 16 microssatélites no total, sendo um tetranucleotídeo e os demais dinucleotídeos. Todos microssatélites perfeitos, com exceção de um composto. Dentre os 16 microssatélites obtidos, foram desenhados 12 pares de iniciadores complementares as regiões franqueadoras das sequências contendo microssatélites com boa qualidade de sequenciamento. Na Tabela 6 são relacionadas às características dos 12 pares de iniciadores que foram sintetizados quimicamente.

Dos doze pares de iniciadores enviados à síntese química e submetidos à otimização, 11 iniciadores mostraram *amplicons* (Tabela 7). A programação da PCR foi feita em *Touchdown*, com dois esquemas de temperaturas: um utilizando a temperatura inicial de 60ºC e final de 50ºC e outro usando 55ºC a 45ºC, com sistema desnaturante em géis de poliacrilamida a 7%.

Tabela 6 - Relação dos iniciadores que foram sintetizados para o complexo *Dioscorea cayenensis/D.rotundata,* incluindo os nomes do iniciadores, a sequência dos mesmos, a temperatura (Tm), tamanho do iniciador, tamanho do fragmento seqüenciado, tamanho da sequência, o motivo, a percentagem de citocina/guanina (CG%) e o tipo de microssatélite, em relação à unidade repetitiva

Nome	*Iniciador forward / reverse*	Tm	Tamanho Iniciador pb	Tamanho fragmento pb	Tamanho sequência pb	Motivo	CG%	Tipo
Cay 1	AAGACTGTCAACCTCCCACA TGGATTGTGAAGCCATTGTT	60 56	20 21	155	885	(TA)6	50 40	Dinucleotídeo
Cay 2	TGGATTGTGAAGCCATTGTT GCATGACCTTCAAAAATACACC	60 62	24 23	171	905	(GT)15	42,9 40,9	Dinucleotídeo
Cay 3	CAGCCCACTTGCATAGAATG AGCTTGAGTCGGTGAGAAGG	60 62	20 20	218	861	(GT)10	50 55	Dinucleotídeo
Cay 4	ATGGGGCACATAAATTAGGG CAATAAATAAACACTTGAGACACGA	58 66	20 25	300	896	(CA)8+(TA)6	45 32	Dinucleotídeo
Cay 5	AATGTTTGATCCCTCAATGG CACCCGTAATTGGTTACATGG	56 62	20 21	249	907	(AC)16	40 47,6	Dinucleotídeo
Cay 6	TGCTTACTCCTTGACCCTCTAA TGCATCCCAAACCTTGATTA	64 56	22 20	210	696	(TG)6	45,5 40	Dinucleotídeo
Cay 7	GCTTTCCCTCCCAAGAACT TGGCAGTCCTTATCCAGTCA	58 60	19 20	196	905	(CA)10	52,6 50	Dinucleotídeo
Cay 8	TACGAGGCTCTAGCGGTGAT CGTATTCCCTTGAGTGTATAGCAA	62 68	20 24	232	884	(CT)18	55 42	Dinucleotídeo
Cay 9	GACAATCAATGAGAGCCCAAC TGGCTTAACTATGGCGGACT	56 60	20 20	207	505	(TC)9	40 50	Dinucleotídeo
Cay 10	CGGGTGTGATGTATGAGAGC GCTGGTTGCTTAAATGATGG	62 58	20 20	191	900	(GA)18	55 45	Dinucleotídeo
Cay 11	CCCTATGAATGAGGAACCCTA GCCCAGCAAATGGTAGATGT	62 60	21 20	125	878	(AG)14	47,6 50	Dinucleotídeo
Cay 12	GACAATCAATGAGAGCCCAAC TGGCTTAACTATGGCGGACT	56 60	21 20	190	-	(TG)9	50 48	Dinucleotídeo

Tabela 7 - Amplificação dos iniciadores para cinco indivíduos do complexo *D. cayenensis/D. rotundata* em gel de poliacrilamida 7%, incluindo o motivo dos iniciadores, o tamanho e amplitude das bandas esperadas e observadas no gel e o tipo de esquema do *Touchdown*

Iniciadores	**Motivo**	**Tamanho esperado (pb)**	**Amplitude observada (pb)**	***Touchdown***
Cay 1	(TA)6	155	145-160	55ºC-45ºC
Cay 2	(GT)15	171	187-193	60ºC- 50ºC
Cay 3	(GT)10	218	202-220	55ºC-45ºC
Cay 4	(CA)8+(TA)6	300	276-290	55ºC-45ºC
Cay 5	(AC)16	249	198-250	55ºC-45ºC
Cay 6	(TG)6	210	190-210	55ºC-45ºC
Cay 7	(CA)10	196	185-205	60ºC-50ºC
Cay 8	(CT)18	232	197-205	55ºC-45ºC
Cay 9	(TC)9	207	195-205	55ºC-45ºC
Cay 10	(GA)18	191	136-195	60ºC-50ºC
Cay 11	(AG)14	125	73-83	60ºC-50ºC

4.3.3 Caracterização e genotipagem dos microssatélites

Pela avaliação dos 11 iniciadores específicos de microssatélites resultante da biblioteca enriquecida, para os 48 acessos estudados (22 acessos da espécie *Dioscorea cayenensis* e 26 acessos de *D. rotundata*) somente dois locos, correspondentes aos iniciadores Cay 1 e Cay 7, foram monomórficos para os acessos avaliados nesse estudo. Um iniciador heterólogo (Dpr3F12) de Tostain et al. (2006) foi incluído na genotipagem, o qual se mostrou polimórfico.

Os valores do número de bandas e o conteúdo de polimorfismo (PIC) para cada iniciador podem ser observados na Tabela 8. Baseado no PIC, todos os iniciadores foram classificados como muito informativos (PIC > 0,5) de acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), com exceção do iniciador Cay 8, em que o PIC foi de 0,34 (Tabela 8). Os valores de PIC para os iniciadores variaram de 0,34 a 0,70 (detectado no iniciador Dpr3F12), apresentando um valor médio de 0,57.

Tabela 8 - Valores referente ao número de bandas e ao conteúdo de polimorfismo (PIC)

Primer	N[1]	Nº de bandas	PIC
Cay 2	48	3	0,54
Cay 3	48	3	0,58
Cay 4	48	3	0,59
Cay 5	48	4	0,66
Cay 6	48	3	0,55
Cay 8	48	2	0,34
Cay 9	48	3	0,55
Cay 10	48	3	0,57
Cay 11	48	4	0,67
(Dpr3F12)[2]	48	4	0,70
Média	-	-	0,57

[1] N: número de indivíduos analisados; [2] Iniciador desenvolvido por Tostain et al. (2006)

Para o cálculo da diversidade genética, usando o índice de Shannon usando os marcadores microssatélites, realizaram-se duas análises separadamente (Tabela 9). A primeira foi feita separando os acessos por espécies: 22 acessos de *D. cayenensis* e 26 acessos de *D. rotundata*. Os valores apresentaram um índice de Shannon superior para os acessos da espécie *D. cayenensis* (*H'* = 0,27) e inferiores para os acessos da espécie *D. rotundata* (*H'* = 0,23). Numa segunda análise, mantiveram-se os acessos, mas separados por região. O valor do índice de Shannon foi superior para os acessos da região sul (*H'* = 0,31), intermediário para os acessos da região sudeste (*H'* = 0,27) e inferior para os acessos da região nordeste (*H'* = 0,21). Ambas as análises estão concordantes entre si, uma vez que os acessos que predominam nas regiões Sul e Sudeste, que apresentaram os maiores índices de diversidade, pertencem à espécie *D. cayenensis*, que também apresentou a maior diversidade.

Tabela 9 - Análise da diversidade genética gerada apartir dos marcadores microssatélites, pelo Índice de Shannon entre os acessos das espécies *D. cayenensis e D. rotundata* e entre as regiões de coleta de inhame (*Dioscorea cayenensis/D.rotundata*)

Acessos	Índice de Shannon
Dioscorea cayenensis	*H'* = 0,27
Dioscorea rodundata	*H'* = 0,23
Nordeste	*H'* = 0,21
Sudeste	*H'* = 0,27
Sul	*H'* = 0,31

Na análise de coordenadas principais (Figura 6) observou-se a formação de grupos consistentes entre os acessos por região. As duas primeiras coordenadas principais apresentaram 42,4% e 20,2% da variação total. Para a coordenada principal 1, observou-se que os acessos da região Nordeste agruparam-se à esquerda desta coordenada, sendo que um deles (nº 48) mostrou-se em posição mais à direita. Os acessos da região Sudeste agruparam-se à direita, com exceção de um acesso (nº 22), situou-se no grupo da região Nordeste. Já para os acessos da região Sul, um mostrou-se em posição intermediária aos dois grupos (nº 24), enquanto que um acesso (nº 25) situou-se no grupo da região Nordeste e outro (nº 23) da região Sudeste.

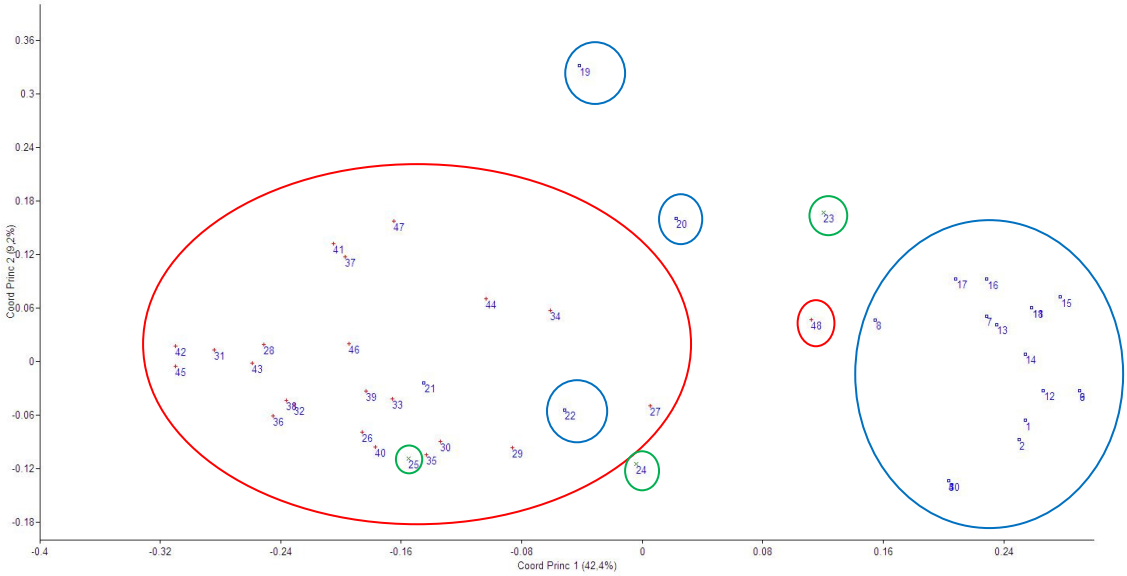

Figura 6 - Gráfico de dispersão para a análise de coordenadas principais utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard para 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata*, de três regiões: Sudeste (azul), Sul (verde) e Nordeste (vermelho), avaliados com marcadores microssatélites

No dendrograma apresentado na Figura 7, observou-se, da mesma forma, a divisão dos acessos em dois grandes grupos de acordo com a região amostrada, com a separação nítida dos acessos do Sudeste e do Nordeste. Entre os acessos do Sul, observou-se que um situou-se numa posição intermediária, enquanto que os outros dois mostraram-se semelhantes a ambos os grupos. Esses dados estão corroborando com os dados encontrados para a caracterização genética morfológica, onde foi observado também a separação nítida dos acessos da região Nordeste e Sudeste. Os acessos coletados na região Sudeste de acordo com os caracteres morfológicos são equivalentes à espécie *D. cayenensis*, enquanto que os acessos do Nordeste referem-se à espécie *D. rodundata*.

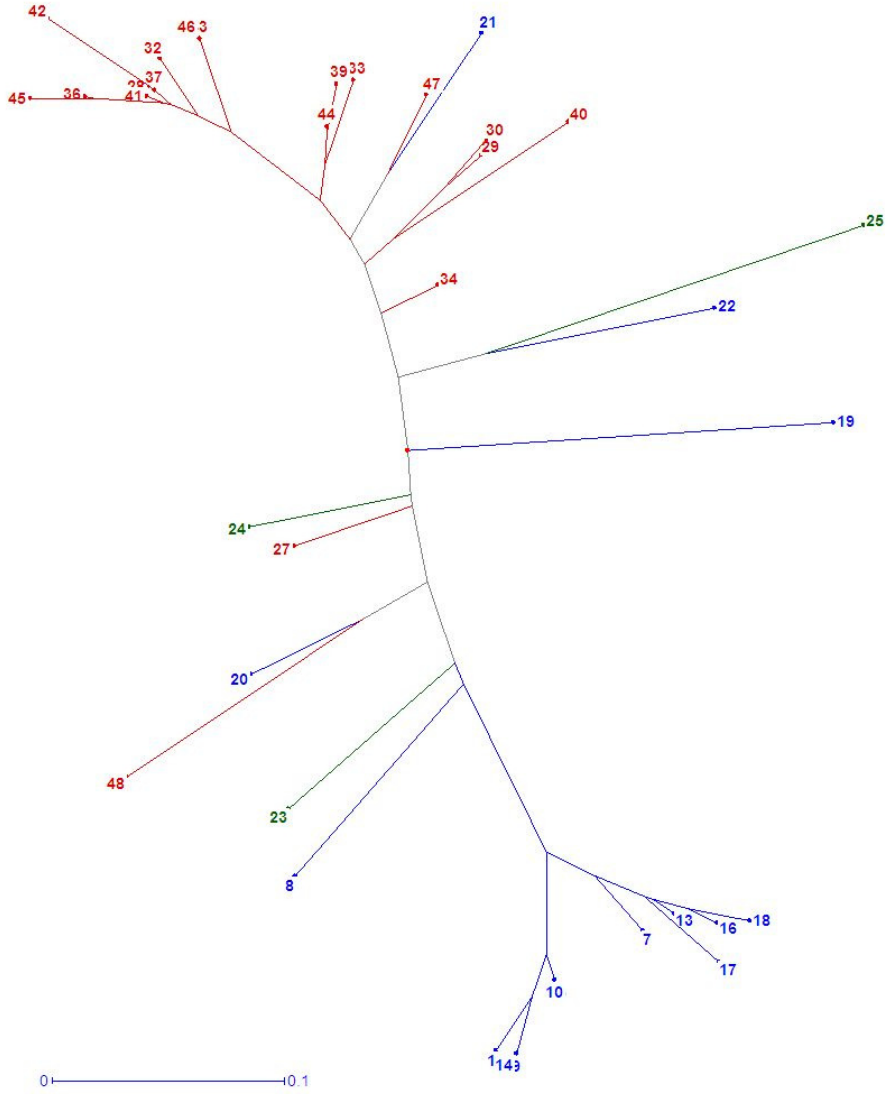

Figura 7 - Dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard e método agromerativo de Neighbor-Joining para 48 acessos de *D. cayenensis/D. rotundata*, de três regiões: Sudeste (azul), Sul (verde) e Nordeste (vermelho), avaliados com marcadores microssatélites

Na Tabela 10 realizou-se a AMOVA por região de estudo e verificou-se que a maior parte da variabilidade (51,61%; P<0,01), encontra-se entre regiões, embora seja também expressiva a porcentagem da variação total atribuída à variação dentro de regiões (48,39%). Esses resultados também estão corroborando com os dados observados pela caracterização morfológica, desta forma evidenciando uma alta diferenciação genética entre as regiões tanto para marcadores morfológicos e moleculares. Através de caracteres morfológicos, observou-se que a espécie *D. cayenensis*, se originou principalmente nas regiões sul e sudeste, enquanto que *D. rotundata*, na região Nordeste. Portanto, pode-se inferir que grande parte desta

diferenciação encontrada tanto para marcadores morfológicos e moleculares entre regiões deve-se à própria diferenciação entre ambas as espécies.

Tabela 10 - Análise de variação molecular (AMOVA) para 48 acessos de inhame (*Dioscorea cayenensis/ D. rotundata*) originários de três regiões do Brasil: sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo) e nordeste (Pernambuco e Paraíba), avaliados com dez iniciadores microssatélites

Fonte de Variação	G.L	SQ	% da variação total	Valor de *P*[1]
Entre regiões	2	23,250	51,61	0,0000
Dentro de regiões	45	34,313	48,39	-
Total	47	57,562	-	-

[1]Número de permutações = 1023

Na Tabela 11, a AMOVA foi realizada, considerando-se as duas espécies separadamente. Observou-se que a maior parte da variabilidade se encontra entre espécies (59,08%; P<0,01). No entanto, uma diferenciação ainda significativa (40,92%), foi atribuída à variação dentro de espécies ou seja há diversidade genética dentro de cada espécie. Esses dados confirmam a hipótese formulada anteriormente, que nesse caso pode-se tratar de duas espécies distintas, *D. cayenensis* e *D. rotundata* para os acessos analisados.

Tabela 11 - Análise de variação molecular (AMOVA) para 22 acessos da espécie *Dioscorea. cayenensis*) e 26 acessos de *D. rotundata*, originários de três regiões do Brasil: sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo) e nordeste (Pernambuco e Paraíba), avaliados com dez primers de microssatélites

Fonte de Variação	G.L	SQ	% da variação total	Valor de *P*[1]
Entre espécies	1	37,301	59,08	0,0000
Dentro de espécies	44	48,062	40,92	-
Total	45	85,370	-	-

[1]Número de permutações = 1023

Todas as análises de estrutura e dissimilaridade populacional entre os acessos sugerem que existe isolamento geográfico entre os acessos. Esta constatação é suportada a partir de uma alta correlação e significativa entre as distâncias genéticas para marcadores morfológicos e moleculares (r = 0.56; P<0.01), entre as distâncias geográficas e distância genética para marcadores morfológicos (r = 0,68; P<0,01) e entre as distâncias geográficas e distância genética para marcadores moleculares (r = 0,64; P<0,01), segundo o teste de Mantel (MANTEL, 1976).

5 DISCUSSÃO

De acordo com as coletas realizadas, o cultivo de inhame (*Diocorea cayenensis/D. rotundata*) é feito principalmente por agricultores de pequena escala (agricultura familiar), que normalmente utiliza a roça como unidade de plantio. Mahalakshmi et al. (2007) mostram que o cultivo de inhame na África, onde se localiza o centro de origem e diversidade dessas espécies é realizado também por pequenos produtores. Segundo Peroni et al. (2007), as roças são de fundamental importância para a conservação da agrobiodiversidade. Nesses locais diversas espécies são cultivadas, com múltiplas finalidades, sendo que as roças são locais de alta biodiversidade.

A agricultura tradicional de pequena escala desempenha um papel fundamental na manutenção da diversidade de plantas cultivadas e/ou domesticadas, representando uma forma importante de conservação *in situ* de recursos genéticos para as gerações futuras (JARVIS et al., 2000; PERALES et al., 2003; ZIZUMBO-VILLARREAL et al., 2005; BRESSAN et al., 2005). Para Sundersus (2008), todo agricultor e sua família, segundo o mesmo autor, tem em seu conjunto, práticas e técnicas coerentes com a sua realidade e finalidade do seu sistema de produção, uso do solo e com as suas necessidades essenciais, que compatibilizam os objetivos familiares e com o meio ambiente.

Na agricultura de pequena escala geralmente somente os membros da família estão envolvidos nas atividades de campo. Assim, o cultivo de inhame no Brasil é caracterizado, na maioria das vezes, pela ausência de jovens nas atividades de campo e pouco envolvimento das mulheres. De acordo com o resultado obtido pelo o questionário semi-estruturado realizado nas coletas, 89% dos entrevistados eram homens. Isso é explicado devido a penosidade e a imagem negativa do trabalho agrícola, que desta foram colaboram para que o meio rural não apresente atrativos para a permanência dos jovens e em consequência tem-se o envelhecimento e a masculinização do meio rural em todo o Brasil (GODOY et al., 2010).

Em relação à origem das variedades mantidas pelos agricultores familiares, diversas procedências foram encontradas. Dados semelhantes foram obtidos por Tamiru et al. (2008), onde observaram que não existia um sistema formal de fornecimento de sementes de inhame na Etiópia, bem como agricultores especializados na produção de materiais para o plantio. Por se tratar de uma espécie de propagação vegetativa, esses índices indicam uma provável uniformização dos materiais mantidos pelos agricultores, embora tenha se observado variações morfológicas entre as variedades.

A perda de recursos genéticos também foi constatada quando os agricultores afirmaram já ter plantado variedades de inhame que atualmente não plantam mais. Camarano e Abramovay

(1999) verificaram que a maior parte das comunidades de agricultores de pequena escala está, atualmente, sujeita à influência da crescente modernização do meio rural e inserção na economia de mercado. Uma preocupação que se impõe, nesta situação, é a da continuidade deste modo de vida. Há vários fatores que vêm desafiando a continuidade da agricultura praticada por populações autóctones e por pequenos produtores familiares. Entre eles, pode-se citar a expansão da agricultura industrial em vastas regiões, o aumento da concentração fundiária; e a ampliação de oportunidades de trabalho não agropecuário no campo (setor industrial e de serviços). Em vista disto, uma parcela expressiva das novas gerações rurais tem, ou emigrado, ou se engajado em atividades dos setores secundário e terciário na área rural.

Em se tratando do desenvolvimento dos microssatélites, a porcentagem de enriquecimento dos clones positivos obtida com as construção das bibliotecas foi baixa (14% na primeira e 12% na segunda biblioteca), de acordo com o protocolo de Billote et al. (1999), que considera alto com cerca de 20 e 70% de enriquecimento.

Esta porcentagem pode depender de vários fatores. Existem fatores inerentes à espécie, como a presença de poucas regiões repetitivas no genoma e a composição de bases do mesmo, a qual interfere sobre a enzima de restrição utilizada durante a digestão. A posição do sítio de clivagem da enzima de restrição no DNA pode influenciar o tamanho do fragmento obtido e a representatividade das regiões repetitivas amostradas, indicando que o uso combinado de enzimas com sítios de clivagem distintos pode produzir fragmentos entre 200 a 1000 pb, ideais para os demais passos da construção da biblioteca. Outro fator são as terminações dos fragmentos digeridos, que podem dificultar a ligação dos adaptadores, o que requer condições experimentais ótimas para a ligação e adaptadores que, por sua vez, possuam elementos de terminação coesivos. Na etapa de hibridização com sondas biotiniladas, os tipos de sonda utilizados e as condições de lavagem das microesferas também pode influenciar sobre a obtenção de sequências repetidas (ZANE et al., 2002).

Um estudo realizado por Tostain et al. (2006) para o desenvolvimento de iniciadores para três espécies (*D. alata*, *D. abyssinica* e *D. praehensilis*), usando a metodologia da biblioteca enriquecida, resultou em 16 pares de iniciadores. Deste trabalho surgiram os primeiros iniciadores microssatélites para o gênero *Dioscorea.* Hochu et al. (2006), a partir também de uma biblioteca enriquecida, desenharam 20 iniciadores de microssatélites para espécie *D. trifida*, sendo que apenas oito pares de iniciadores apresentaram bandas polimórficas e de boa resolução. Siqueira et al. (2011) sintetizou 14 pares de iniciadores para a espécie *D. alata*, sendo que dez foram amplificados com sucesso. O presente estudo resultou

em 12 pares de iniciadores, visto que 11 iniciadores mostraram *amplicons,* sendo esse resultado coerente com a literatura.

Vários caracteres são utilizados para classificação das etnovariedades de inhame, sendo que, de acordo com Tamiru et al. (2008), a cor da polpa dos tubérculos de inhame é o mais importante critério de seleção e classificação. No presente estudo os descritores de maior importância que permitiram a discriminação das espécies do complexo *Dioscorea cayenensis/ D.rotundata* foram os seguintes: a forma da folha orbiculada e a cor amarela dos tubérculos para a espécie *D. cayenensis* e a folha ovalada e cor branca dos tubérculos para *D. rotundata*. Dansi et al. (1999) estabeleceram uma chave de identificação para diferenciação cultivares do complexo *Dioscorea cayenensis/ D. rotundata* e observaram também caracteres relacionados a forma da folha e a cor dos tubérculos como descritos importantes na diferenciação das espécies citadas anteriormente.

Na análise das coordenadas principais realizadas nesse estudo tanto para caracteres morfológicos como moleculares, houve formação de grupos consistentes entre os acessos por região de coleta. Os acessos com caracteres morfológicos discriminados para a espécie *D. cayenensis* se agruparam na região Sudeste e Sul, e os acessos identificados como *D. rotundata* se agruparam na região Nordeste. Nas análises de agrupamento observou-se também a formação de dois grupos bem definidos, tanto para os caracteres morfológicos como para os moleculares, semelhante ao que foi observado na análise anterior. Resultados similares foram encontrados por Dansi et al. (2000b), que analisaram 465 acessos do complexo *Dioscorea cayenensis/ D. rotundata*, através de marcadores isoenzimáticos coletados em diferentes localidades da República de Benin no sistema de agricultura tradicional. Observaram a separação nítida das duas espécies, através da análise de agrupamento. Mignouna et al. (2002) analisaram 45 acessos do complexo *Dioscorea cayenensis / D. rotundata* usando tanto caracteres morfológicos como isoenzimáticos, também observando a formação de dois grupos consistentes através de análise de agrupamento e das coordenadas principais.

Considerando a estruturação genética dos acessos avaliados para os dois tipos de marcadores genéticos (morfológicos e microssatélites) observou-se que a maior parte da variabilidade se encontra entre regiões, confirmando a hipótese de duas espécies diferentes, cultivadas em regiões diferentes no Brasil. E essa variabilidade genética se encontra estruturada no espaço, conforme observado pela alta e significativa correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas obtida neste estudo para ambos os marcadores Alguns estudos da literatura verificaram que não há correlação entre distâncias genéticas e distâncias

geográficas, mas encontraram alta diversidade em cultivares de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis* e *D. rotundata* (TOSTAIN et al. 2007, ZANNOU et al. 2009).

Diante dessas constatações pode-se sugerir que no Brasil existem duas espécies, *D. cayenensis* e *D. rotundata,* e não o complexo de espécies e que ambas as espécies estão sendo cultivadas em regiões diferentes. Sugere-se que no Brasil essas espécies foram introduzidas em locais diferentes e atualmente existe um isolamento geográfico mantendo-as separadas entre si.

6 CONCLUSÕES

A construção de biblioteca genômica para a síntese de marcadores SSR no complexo *Dioscorea cayenensis/ D. rotundata* é inédita e as informações geradas são de suma importância para a identificação, exploração e a conservação da variabilidade genética dessas espécies ou complexo de espécies, além de ser de extrema importância para os programas de melhoramento do inhame.

Os marcadores SSR sintetizados nesse trabalho poderão ser utilizados para a análise de genótipos de inhame em outros estudos de diversidade ou mapeamento genético.

Existe grande variabilidade genética para as etnovariedades de inhame cultivadas em diversas regiões do Brasil.

A maior parte da variabilidade genética se encontra estruturada entre regiões e entre espécies nos acessos avaliados.

A variabilidade genética se encontra estrutura no espaço, evidenciada pela correlação entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas.

Os parâmetros obtidos por microssatélites são coerentes com dados obtidos por marcadores morfológicos no complexo *Dioscorea cayenensis/D. rotundata.*

No Brasil ocorre uma separação nítida entre as espécies *D. cayenensis* e *D. rotundata*, as quais ocorrem em diferentes regiões, com predominância de *D. cayenensis* nas regiões Sul e Sudeste e de *D. rotundata* no Nordeste. Entretanto, recomenda-se estudos mais aprofundados utilizando tamanhos de amostragem mais significativos para se confirmar tal constatação.

Os dados de divergência genética obtidos serão úteis em programas de melhoramento genético de inhame no Brasil e também podem ser utilizados para fins de conservação *in situ/on farm*.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, K.; SREEKUMARI, M.T.; SHEELA, M.N. Seed production strategies and progeny selection in greater yam breeding. In: PROCEEDINGS OF 14TH TRIENNIAL SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOTS CROPS, 2006, India, **Anais…** India: SNA, 2006. p. 51-52.

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.27, p. 617-631, 2008.

AIYELOJA, A.A.; BELLO, O. A. Ethnobotanical potentials of common herbs in Nigéria: A case study of Enubu state. **Educational Research and Review**, Washigton, v.1, p.16-22, 2006.

AKORODA, M.O.; CHHEDA, H.R. Agro-botanical and species relationships of Guinea yams. **Tropical Agriculture**, Trinidade, v.60, p.242-248, 1983.

ALVES, R. M.; SEBBERNN, A.M.; ARTERO, A.S.; FIGUEIRA, A. Microsatelite loci transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, n.2, p.1219-1221, 2006.

AMOROZO, M.C.M. Management and conservation of *Manihot esculenta* Crantz germplasm by traditional farmers in Santo Antônio do Leverger, Mato Grosso State, Brasil. **Etnoecologica**, México, v.4, n.3, p.69-83, 2000.

AMOROZO, M.C.M. Maintenance and management of agrobiodiversity in small-scale. **Functional Ecosystems and Communities**, Middlesex, v.2, n.1, p.11-20, 2008.

ARIZIO, C.M.; HOMPANERA, N.; MANISFESTO, M.M. Genotypic identification and diversity evaluation of a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L). Lam) collection using microsatellites. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Rome, v.7, n.2, p.135-138, 2009.

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**, New York, v. 118, p.1239-1249, 2009.

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.2, p. 341-351, 1996.

AUREA, C. ROSS, A. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.8, n.1, p.135-138, 2008.

AYENSU, E.S. Dioscoreales. In: METCALFE, C.R (ed). **Anatomy of the monocotyledons.** London: Oxford University Press, 1972. p.181-182.

BARBIE, E. **The practice of social research**. 6ª Ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1991.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microssatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Les Ulis, v.54, p.277-288, 1999.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 32, p. 314-331, 1980.

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**, New York, v. 113, n.3, p. 439–451, 2006.

BRESSAN, E.A. **Diversidade isoenzimática e morfológica de inhame (*Dioscorea* spp.) coletados em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira – SP**. 2005. 172p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

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, n.5, p. 8-13, Julho. 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.

CEREDA, M.P. Importância das tuberosas tropicais. In: Carmo, C.A.S. (Ed.) **Inhame e taro: Sistema de produção familiar**. João Pessoa: EMEPA, 2002. p. 27-32.

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

CORDEIRO, G.M., TAYLOR, G.O., HENRY, R.J. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.), a highly polyploid species. **Plant Science**, Ottawa, v.155, n. 6, p.161–168, 2000.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining**. Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.19, n.5, p.299-306, 2001.

CURY, R. **Dinâmica evolutiva e caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) na agricultura autóctone**. 1993. 103p. Dissertação (Mestrado em

Genética) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1993.

CURY, R. **Distribuição da diversidade genética e correlações de caracteres em etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) provenientes da agricultura tradicional do Brasil**. 1998.163p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – ESALQ/Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1998.

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; ZOUNDJIHEKPON, J.; SANGARE, A.; ASIEDU, R.; QUIN, F.M. Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/D. rotundata)* complex in BeninRepublic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.46, p.371–388, 1999.

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; PILLAY, M.; AND ZOK, S. Ploidy variation in the cultivated yams (*Dioscorea cayennensis-Dioscorea rotundata* complex) from Cameroon as determined by flow cytometry. **Euphytica**, Wageningen, v.119, p.301-307, 2001.

DANSI, A., MIGNOUNA, H.D., ZOUNDJIHÉKPON, J., SANGARE, A., ASIEDU, R. & AHOUSSOU, 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, p.371-383, 2000a.

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

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; AND ZOUNDJIHÈKPON, J. Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayennensis/D. rotundata*) complex in Benin Republic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.46, p.371–388, 1999.

DEGRAS, L. Quelques données sur la variabilité de descendance d'igname Cousse-couche *D. trifida*. In : VIIE CONGRES SOC. INTER-CARAÏBE POUR LES PLANTES ALIMENTAIRES (CFCS), 1969, Guadeloupe, **Anais…** Guadeloupe : INRA, 1969. p.59-65.

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

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature**, London, v.5, n.9, p.435-446, 2004.

FAO. **FAOSTAT 2011 Data base.** Disponível em: http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor. Acesso em 19.jun.2011.

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

FREITAS, F.O.; MORETZSOHN, M.C.; VALLS, J.F.M. Genetic variability of Brazilian indian landraces of *Arachis hypogaea* L. **Genetics and Molecular Research**, Dordrecht, v.6 , n. 3 p. 675-684, 2007.

GANEVA, G. KORZUN, V.; LANDIEVA, S.; POPOVA, Z.; CHRISTOV, N. Genetic diversity assessment of Bulgarian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) landraces and modern cultivars using microsatellite markers. **Genetics Resources and Crop Evolution,** Dordrecht, v.57, n.2, p. 273-285, 2010.

GODOY, C.M.T.; PÉREZ, F.I.C.; WIZNIEWSKY, J.G.; GUEDES, A.C.; MORAES, C.S. Juventude rural, envelhecimento e o papel da aposentadoria no meio rural: A realidade do município de Santa Rosa/RS. In: CONGRESSO SOBER (Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 48. 2010. Mato Grosso do Sul – MS, **Anais…** Mato Grosso do Sul – MS, 2010. 1 CD-ROM.

HAMON, P., AND TOURÉ, B. Characterization of traditional yam varieties belonging to the *Dioscorea cayennensis-rotundata* complex by their isozymic patterns. **Euphytica**, Wageningen, v.46, p.101-107, 1990.

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. p.137–140, 2006.

IPGRI/IITA. **Descritores para el ñame (*Dioscorea* spp.)**. Roma, Itália. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadán, Nigéria/International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 61 p.

ISPIZÚA, N. V. Genetic diversity of potato landraces from northwestern Argentina assessed with simple sequence repeats (SSRs). **Genetic Resources and Crop Evolution,** Dordrecht, v.54, p.1833-1848, 2007.

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: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. 190p.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids.** Wallingford: CABI, 2009. 440p. (Crop production science in horticulture series, 17).
LEBOT, V.; TRILLES, B.; NOYER, J.L.; MODESTO, J. Genetic relationships between *Dioscorea alata* L. cultivars. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht , v.45, p.499-509, 1998.

MAHALAKSHMI, V.; NG, Q.; ATALOBHOR, J.; OGUNSOLA, D.; LAWSON, M.; ORTIZ, R. Development of a West African yam *Dioscorea* spp. core collection. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, p.1817–1825, 2007.

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, n.4, p. 919-929, 2005.

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

MARTIN, F.W. The relationship of *Dioscorea cayenensis* and *D. rotundata.* **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.55, p.193-206, 1978.

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.

MARTINS, P.S. Dinâmica evolutiva em roças de caboclos Amazônicos. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.19, n.53, p. 209-220, 2005.

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

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 dos componentes principais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p. 619-623, 2000.

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.

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**, Cambridge, v.142, n.12, p. 269-276, 2003.

MIGNOUNA, H.D., DANSI, A., AND 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.

MIZUKI, I TANI, N., ISHIDA, K., TSUMURA**,** Y. Development and characterization of microsatellite markers in a clonal plant, *Dioscorea japonica* Thunb. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, p. 721-723, 2005.

MONTEIRO, D.A. Situação atual e perspectiva do inhame no estado de São Paulo. In: CARMO, C.A.S. (Ed.) **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória, ES: 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.

OBIDIEGWU, J.E.; KOLESNIKOVA-ALLEN, M.; ENE-OBONG, E.E.; MUONEKE, C.O.; ASIEDU, R. SSR markers reveal diversity in Guinea yam (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) core set. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.8, n.12, p.2730-2739, 2009.

OLIVEIRA, E. J. PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.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. Distribuição geográfica e taxonomia das famílias Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. In: Carmo, C.A.S. **Inhame e taro**: sistemas de produção familiar. Vitória, ES: Incaper, 2002. p.15-26.

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, Jul. 1999.

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, n. 92, n.2, p. 171-183, 2002.

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.

PERALES, H.; BRUSH, S.B.; QUALSET, C.O. Dynamic management of maize landraces in Central Mexico. **Economic Botany**, New York , v.57, p.21-34, 2003.

SADIK, S.; OKEREKE, O.U. A new approach to improvement of yam *Dioscorea rotundata*. **Nature**, London, v.254, p.134-135, 1975.

SANTOS, E.S. **Cultura do inhame (*Discorea ssp.*)**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 2002. 9p.

SCARCELLI, N.; DAÏNOU, O.; AGBANGLA, C.; TOSTAIN, S.; PHAM, J.L. Segregation patterns of isozyme loci and microsatellite markers show the diploidy of African yam *Dioscorea rotundata* (2n=40). **Theoretical and Applied Genetics**, Dordrecht, v.111, p.226-232, 2005.

SCARCELLI, N.; TOSTAIN, S.; MARIAC, C. 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.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. ***Arlequim:* a software for population data analysi***s*. Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry laboratory, versão 2000. http://anthropologie.unige.ch/arlequin. Acesso em 14/10/2004.

SHARMA, K.; MISHRA, A.K.; MISRA, R.S. A simple and efficient method for extraction of genomic. DNA from tropical tuber crops. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, p.1018-1022, 2008.

SIQUEIRA, MVBM; MARCONI, TG; BONATELLI, ML; 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 Primer Notes & Protocols,** St. Louis, v.98, n.6, p.141-146, 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. **Biocheminal Genetics**, Netherlands, v.48, p.879-895, 2010.

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, n.1, 104-110, 2009.

TAMIRU, M.; BECKER, H.C.; MAASS, 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.

TOSTAIN, S.; AGBANGLA, C.; SCARCELLI, N.; MARIAC, C.; DAINOU, O.; BERTHAUD, J., AND PHAM, J.L. Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Rome, v.5, n.2, p. 71-81, 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, n.2, p.173-175, 2006.

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

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

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, jul./ago. 2007.

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.** Canada: Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, 1997. 245p.

ZANE, L.; BARCELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellites isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p. 1-16, 2002.

ZHANG, P. DREISIGACKER, S. BUERKERT, A. ALKHANJARI, A. MELCHINGER, A.E. Genetic diversity and relationships of wheat landraces from Oman investigated with SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. Dordrecht, v. 53, p. 1351–1360, 2006.

ZIZUMBO-VILLARREAL, D.; COLUNGA-GARCIAMARÍN, P.; CRUZ, E.P.; DELGADO-VALERIO, P.; GEPTS, P. Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. **Crop Science**, Madison, v.45, p.1073-1083, 2005.

ANEXO

ANEXO A - Roteiros para entrevistas sobre o sistema de cultivo e variedades:

a) Caracterização socioeconômica:
Data da entrevista:_____ Local de ocupação nº:_____.
Município:_____Bairro:_____
Localização em GPS: _____
1. Nome:_____ 2. Sexo: _____
3. Idade:_____
4. Estado civil:_____ 5. Nº de filhos: _____
5. Residentes: ( ) cônjuge – idade:_____
( ) filho (s) / homem – idade (s): _____
( ) filha (s) /mulher – idade (s) :_____
( ) outros:_____ - idade (s) : _____
_____ - idade (s) : _____
6. Local de nascimento:_____
7. Local de nascimento do cônjuge:_____
8. Tempo de residência no local ou região:_____
9. Local da última procedência _____
10. Tempo de residência do cônjuge no local ou região:_____
11. Relação com a terra / local de ocupação:
( ) 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 localizada no interior da propriedade em que é caseiro.
( ) outra situação:_____
( ) Posseiro. Extensão da posse:_____.
( ) roça localizada no interior da própria posse.
( ) roça localizada fora dos limites da própria posse:_____
( ) outra situação:_____
( ) Outros:_____
12. 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 :
( ) Quintal:_____ ( ) Roça:_____
3. Disposição das cultivares/variedades:
( ) Quintal ( ) Consorciadas ( ) Separadas
( ) Roças ( ) Consorciadas ( ) Separadas
4. Tempo de uso da (s) área (s) de cultivo:
( ) Quintal:_____
( ) Roça:_____
5. Nº de pessoas que trabalham / auxiliam na (s) área (s) de cultivo:
( ) Familiares: _____( ) Não familiares:_____

6. Calendário de atividades:

Etapa de manejo	Quintal	Roça
Limpeza/derrubada/roçada		
Queima/coivara		
Capina/ tratos culturais		
Plantio*		
Colheita*		

* As etapas de plantio e colheita serão detalhadas para cada variedade na questão 11.

7. Como é feita a escolha da área de roça?_____
_____
8. Houve diminuição nas atividades agrícolas? Desde quando? _____
Especificar_____
9. Por quanto tempo as áreas de roça são deixadas em pousio? _____
Sempre foi assim?: _____
10. Retorna às roças abandonadas? Por quê?_____
_____
_____

c) ***caracterização da diversidade (variedades)***

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

Nome da Variedade:	Quintal	Roça	P[1]	C[2]	Usos	Produção
1)_____	( )	( )	_____	_____	_____	_____

Origem desta variedade: _____
Qual a origem do nome? _____
Há quanto tempo planta esta variedade? _____
Porque planta esta variedade? _____

2)_____	( )	( )	_____	_____	_____	_____

Origem desta variedade: _____
Qual a origem do nome? _____
Há quanto tempo planta esta variedade? _____
Porque planta esta variedade? _____

3)_____	( )	( )	_____	_____	_____	_____

Origem desta variedade: _____
Qual a origem do nome? _____
Há quanto tempo planta esta variedade? _____
Porque planta esta variedade? _____
[1]P = época de plantio; [2]C = época de colheita

12. Por que planta mais de uma variedade?_____
13. Já observou florescimento e frutificação nas variedades de cará? Em quais variedades?
_____
14. Já observou germinação de semente nessas variedades? Em quais variedades?
_____
15. Qual o modo de propagação utilizado?_____
16. Houve variedades de cará que plantou no passado e não planta mais? Por quê? _____
_____
17. Aumentou a proporção de alguma variedade? Por quê?_____
_____
18. Usa insumos ou implementos agrícolas? Quais? _____