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

Diversidade genética de variedades tradicionais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivada em comunidades da Baixada Cuiabana em Mato Grosso por meio de microssatélites

Nancy Farfán Carrasco

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

**Piracicaba
2012**

Nancy Farfán Carrasco
Engenheiro Agrônomo

Diversidade genética de variedades tradicionais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivada em comunidades da Baixada Cuiabana em Mato Grosso por meio de microssatélites

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2012

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

Farfán Carrasco, Nancy

Diversidade genética de variedades tradicionais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivada em comunidades da Baixada Cuiabana em Mato Grosso por meio de microssatélites / Nancy Farfán Carrasco. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Diversidade genética 2. Etnovariedades 3. Mandioca 4. Marcador molecular
I. Título

CDD 633.4
F222d

DEDICATÓRIA

*A Deus e a virgem Inmaculada Conceição de
Ninabamba, Acomayo, Perú. Por abençoar
meu caminho dia a dia.*

*Aos meus pais Manuel e Maria pelo cons-
tante apoio. A meus adoráveis irmãos Car-
men Rosa, Jalmar, Yeny Maria, Jackeline e
Crystel.*

AGRADECIMENTOS

É de costume dizer no final, que fazer uma dissertação é um trabalho árduo. Acho que é muito mais que isso, existem etapas tais como os intensos diálogos com a orientadora, a convivência nas disciplinas de formação, as conversas nos corredores e na sala do café, as participações nos congressos, nos encontros científicos, as trocas de correios eletrônicos, o apoio recebido nos momentos de angústia, as sugestões recebidas e o árduo trabalho de revisão constituem um todo coletivo deste trabalho.

Por esses motivos quero dar as graças em especial as seguintes pessoas:

Ao programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG), pelo apoio financeiro concedido (CNPq - número de processo 190031/2010-7).

A minha orientadora professora Elizabeth Ann Veasey, pela oportunidade de ser parte da equipe de pesquisa que comanda, pelo orientação, pelo apoio, assim como a sabedoria que me transmitiu no desenvolvimento da minha formação.

À professora Maria Christina M. Amorozo pelas contribuições ao trabalho, em especial pela informação etnobotânicas que me brindou.

A todos os colaboradores do projeto “Conservação da agrobiodiversidade e dinâmica sócio-econômica entre pequenos agricultores em comunidades rurais da Baixada Cuiabana em Mato Grosso”, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos Agricultores da Baixada Cuiabana em Mato Grosso, por conservar um tesouro valioso para futuras gerações, nossa importante Biodiversidade.

Ao todos os colegas do laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada (LEEGA) pelo apoio que eles me deram.

Ao pessoal que mora comigo, pelo apoio em todo este processo, sobre tudo pela amizade e o carinho.

Ao Dr. Marcos Siqueira pela amizade e orientações desde que comecei este trabalho até agora.

A minha amiga Danielle Muniz pela amizade, apoio e ajuda. Obrigada pelos dias que ficavas comigo até sair meu ultimo gel, fingindo que não estava cansada e me animando a fazer tudo, obrigada mesmo!!!.

Ao Dr. Eduardo Bressan pela ajuda nos processos da elaboração da minha disser-

tação.

A toda a turma latina, pela amizade, pelas reuniões internacionais, que fizeram que tive-se dois anos divertidos, pelos momentos bonitos que ajudaram a diminuir a saudade de nossos países, os quero muito!!.

A meu irmão Jalmar Manuel Farfán Carrasco que amo muito, agradeço a ele por ter-me animado a vir ao Brasil. Pelo grande apoio nesta etapa da minha vida, sou muito grata para ele sendo meu exemplo e digno da minha admiração. Quero agradecer também a Lizandra Castilho Fabio pela amizade e amor, pelas palavras de animo que sempre me deu.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Objetivos	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos	18
1.2 Hipóteses	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Classificação e aspectos botânicos da espécie	21
2.2 Importância da mandioca	22
2.3 Origem e domesticação da mandioca	23
2.4 Conservação da diversidade <i>on farm</i>	24
2.5 Importância nutricional	28
2.6 Marcadores moleculares	29
2.6.1 Marcadores moleculares microsatélites	30
2.7 Diversidade genética em mandioca com marcadores microsatélites	32
2.8 Estrutura genética em populações de plantas	33
2.8.1 Análises de distribuição espacial	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Descrição das comunidades em estudo	39
3.2 Genótipos de mandioca	40
3.3 Extração de DNA	41
3.4 Quantificação de DNA	43
3.5 Amplificação dos locos microsatélites	43
3.6 Eletroforese do produto amplificado	44
3.6.1 Preparação do gel de poliacrilamida	44
3.6.2 Desnaturação e corrida eletroforética das amostras	46
3.6.3 Coloração com nitrato de prata	46
3.7 Análises da diversidade genética	47

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Análises de diversidade genética	49
5 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

Diversidade genética de variedades tradicionais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivada em comunidades da Baixada Cuiabana em Mato Grosso por meio de microssatélites

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma espécie tropical que se destaca como fonte de alimento para os países em desenvolvimento, devido à grande quantidade de amido contido em suas raízes. Estudos indicam que o centro de origem e de domesticação da mandioca é na Amazônia brasileira, mas grande parte da diversidade genética dessa cultura é desconhecida. Este estudo baseou-se na caracterização da diversidade genética no estado de Mato Grosso (MT), especificamente nos municípios de Cáceres, Porto Estrela e Santo Antônio do Leverger, na Baixada Cuiabana. Os genótipos foram provenientes de roças de agricultores tradicionais. Esses campos são considerados como unidades evolutivas para a mandioca. Neste estudo, fizemos uma caracterização de 211 genótipos coletados em 40 roças, em 10 comunidades, nos três municípios citados acima. Essa caracterização foi realizada utilizando 14 locos microssatélites. Encontramos um alto nível de heterozigosidade observada ($\bar{H}_O = 0,587$) e diversidade gênica ($\bar{H}_e = 0,525$), enquanto a maior parte da diversidade genética foi encontrada dentro dos campos de roça (92%). Houve uma separação entre o município de Santo Antônio do Leverger e os municípios de Cáceres e Porto Estrela, provavelmente devido à maior distância geográfica e a proximidade entre os dois últimos municípios. A variabilidade intravarietal, detectada entre as etnovariedades que compartilham o mesmo nome popular, foi elevada (97%). Na análise de agrupamento não se encontrou nenhum agrupamento de genótipos classificados dentro de uma etnovarietade, confirmando os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA). Finalmente, na análise de riqueza alélica, níveis muito elevados foram observados na área de estudo. Esta alta diversidade encontrada, provavelmente se deve ao fato de MT ser considerado como uma das áreas de centro de origem da espécie. No resultado de áreas prioritárias para conservação genética, observou-se que o município de Santo Antonio do Leverger seria considerado como uma área prioritária para a conservação *in situ*, devido à alta diversidade genética encontrada, e pela concentração de frequências constantes para os alelos mais comuns e a presença de alelos privados fixados.

Palavras chaves: *Manihot esculenta*; Diversidade genética; Microssatélites; Etnovariedades; Mato Grosso

ABSTRACT

Genetic diversity of traditional varieties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) grown in communities of Baixada Cuiabana in Mato Grosso through microsatellites

Cassava (*Manihot esculenta*) is a tropical species that stands out as a food source for developing countries due to the large amount of starch contained in its roots. Studies indicate that the center of origin and domestication of cassava is in the Brazilian Amazon, but much of the genetic diversity of this crop is unknown. This study was based on the characterization of genetic diversity in the state of Mato Grosso (MT), specifically in the municipalities of Cáceres, Porto Estrela and Santo Antonio do Leverger of Baixada Cuiabana. The genotypes originated from traditional farmer's swidden fields. These fields are considered as evolutionary units for cassava. In this study, we made a characterization of 211 genotypes collected in 40 swidden fields, in 10 communities, within the three municipalities mentioned above. This characterization was performed using 14 microsatellite loci. We found high levels of observed heterozygosity ($\overline{H}_o = 0.587$) and gene diversity ($\overline{H}_e = 0.525$), whereas most of the genetic diversity was found within the swidden fields (92%). There was a separation between the municipality of Santo Antonio do Leverger and the municipalities of Cáceres and Porto Estrela, which is probably due to the greater geographical distance and proximity between the last two municipalities. A high intravarietal variability (97%) was detected among the landraces sharing the same folk name. In the cluster analysis no clustering of genotypes classified within a landrace were found. Finally, in the analysis of allelic richness, very high levels were observed in the study area. This high diversity found would be given precisely by the fact that MT is considered one of the areas of the center of origin of the species. In the result of priority areas for genetic conservation we found that the municipality of Santo Antonio do Leverger would be considered as a priority area for *in situ* conservation due to the high genetic diversity found, and to the concentration of constant frequencies for the most common alleles and the presence of fixed private alleles.

Keywords: *Manihot esculenta*; Genetic diversity; Microsatellites; Landraces; Mato Grosso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia da mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) com detalhes das folhas jovens e adultas, das inflorescências, fruto e semente (KÖHLER, 1887) .	22
Figura 2 - Distribuição geográfica das populações de <i>M. esculenta</i> ssp. <i>flabellifolia</i> e <i>M. pruinosa</i> identificadas por Olsen e Schaal (2001)	25
Figura 3 - Reação de Polimerase em Cadeia: PCR (VIERSTRAETE, 1999)	30
Figura 4 - Municípios de Mato Grosso onde foram coletados acessos de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	41
Figura 5 - Campo experimental de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)	42
Figura 6 - Quantificação de DNA	43
Figura 7 - Frequências alélicas nos municípios em estudo	52
Figura 8 - Árvore genética para 211 acessos de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) dos municípios de Cáceres (C), Santo Antônio do Leverger (S) e Porto Estrela (P)	58
Figura 9 - Árvore genética das comunidades em estudo: Cáceres (Santo Antônio, Cidade Nova, Junco, Bairro Jardim do Trevo, Bairro Boa Esperança e Bairro Santo Antônio), Santo Antônio de Leverger (Varginha e Barreirinho) e Porto Estrela (Luzia e Banco da Terra)	60
Figura 10 - Porcentagem de etnovariedades observadas na área de estudo, nos municípios de Cáceres, Porto Estrela e Santo Antônio do Leverger	65
Figura 11 - Porcentagem de etnovariedades por município	66
Figura 12 - Árvore genética das etnovariedades no município de Cáceres	67
Figura 13 - Árvore genética das etnovariedades no município de Santo Antônio do Leverger	68
Figura 14 - Árvore genética das etnovariedades no município de Porto Estrela	69
Figura 15 - Riqueza de genótipos diferentes em nível geográfico na área de estudo .	71
Figura 16 - Área prioritária para conservação <i>in situ</i> considerando os municípios de Cáceres, Porto Estrela e Santo Antônio do Leverger	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores (forward/reverse) que foram utilizados para a análise dos microssatélites e seus respectivos tamanhos (pb) para a análise de acessos de mandioca de três municípios da Baixada Cuiabana (* Mba et al. (2001), ** Chavarriaga-Aguirre et al. (1998)	45
Tabela 2 - Número médio de genótipos analisados (N), número médio de alelos por loco ($\bar{A}$), porcentagem de locos polimorficos ($P\%$), Heterozigosidade observada $\bar{H}_o$, heterozigosidade esperada ou diversidade gênica $\bar{H}_e$, para etnovariedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	49
Tabela 3 - Número médio de genótipos (N), número médio de alelos (N_a), porcentagem de polimorfismo ($P\%$), heterozigosidade observada ($\bar{H}_o$), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica ($\bar{H}_e$) e índice de fixação (f), para cada comunidade de procedência dos genótipos de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	51
Tabela 4 - Alelos privados e suas frequências observadas para 211 acessos de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) cultivada em três municípios da Baixada Cuiabana	53
Tabela 5 - Diversidade dentro de roças (H_S), diversidade genética total (H_T), diversidade entre roças (D_{ST}) e proporção da diversidade genética entre roças (G_{ST}), em 14 locos de microssatélites num total de 211 acessos de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) da Baixada Cuiabana	56
Tabela 6 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando 14 locus SSR entre comunidades, entre roças dentro de comunidades e dentro de roças de mandioca em três municípios da Baixada Cuiabana	57
Tabela 7 - Etnovariedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) coletadas por municípios	62
Tabela 10 - Análises de Variância Molecular (AMOVA) para as etnovariedades em estudo, em três municípios de Santo Antônio do Leverger	70

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) é o cultivo alimentício mais importante, originado na Amazônia. É cultivado em todos os trópicos, sendo o sexto maior cultivo produzido no mundo. A mandioca tem desempenhado um papel importante na agricultura mundial, pois esta raiz é cultivada principalmente pelo amido que contém nas raízes tuberosas, chegando a ter cerca de 80% de amido na matéria seca, pelo qual chega a constituir uma oportunidade para resolver problemas das necessidades calóricas e de segurança alimentar de 800 milhões de pessoas em países em desenvolvimento (CEREDA, 2002).

A mandioca é frequentemente cultivada em roças da agricultura autóctone onde apresenta bom desenvolvimento em solos pobres, com resistência a pragas e doenças e adaptação em diferentes regiões edafoclimáticas (HERSHEY, 1994). A grande variabilidade genética existente nas roças de etnovariedades apresenta características favoráveis para a conservação *in situ* e estudos de diversidade genética e evolução. As plantas cultivadas, principalmente as etnovariedades, representam uma forma de recurso genético que deve ser preservado e conservado pois poderá ser utilizado em programas de melhoramento, especialmente na transferência de caracteres qualitativos e quantitativos (FARALDO et al., 2000).

Pela significativa diversidade que possui este cultivo, principalmente em variedades locais, estudos têm sido realizados estimando a diversidade genética em sistemas agrícolas tradicionais, onde se corrobora altos valores de diversidade genética (KERR; CLEMENT, 1980; BOSTER, 1984; SALICK et al., 1997; MÜLHEN, 1999; COLOMBO et al., 2000; MÜLHEN et al., 2000; CARVALHO; SCHAAL, 2001; COSTA et al., 2003; ELIAS et al., 2004; KIZITO et al., 2007; PERONI et al., 2007; VIEIRA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2010; ROJAS et al., 2011; ALVES-PEREIRA et al., 2012). Essa alta diversidade é devido ao intercâmbio de variedades locais desenvolvendo uma rede de troca de manivas entre agricultores de diferentes comunidades e também é devido à inclusão de plantas originadas de reprodução sexual (BOSTER, 1984; EMPERAIRE et al., 1998; PERONI, 1998; SAMBATTI et al., 2001; ELIAS et al., 2004; PUJOL et al., 2007). De fato, as sementes são produzidas no campo antes das plantas serem colhidas; e estas sementes germinam quando a mesma área é cortada depois de um período de pousio e queimadas para o cultivo (ELIAS et al., 2004).

Têm pesquisas onde mostraram os possíveis centros de domesticação, como os trabalhos desenvolvidos por Olsen e Schall (1999) onde que determinaram que os Estados de Mato Grosso e Rondônia representariam os centros de domesticação pelo fato da presença conjunta de populações de mandioca cultivada (*M. esculenta*) e populações de espécies silvestres como *M. flabellifolia*.

Tendo em vista a importância da mandioca na segurança alimentar e por constituir uma cultura que se originou e domesticou no Brasil, é importante fazer a caracterização destas etnovarietades mantidas por agricultores tradicionais em uma das áreas consideradas como centro de origem, utilizando técnicas modernas como caracterização com marcadores microssatélites. A utilização de microssatélites em estudos de diversidade é muito importante devido ao fato de que este marcador oferece grande quantidade de informação pela sua natureza multialélica, codominante, poder discriminativo, reproduzível e pela herança mendeliana que possui. Este tipo de estudo é importante pois os agricultores tradicionais e indígenas são os responsáveis por manter em seus campos de cultivo uma alta diversidade inter e intra-específica. Apesar disto, o risco de perda desta diversidade é grande por diversos fatores ecológicos e sócio-econômicos (PERONI; HANAZAKI, 2002). Até o momento, não se tem estudos sobre a diversidade genética com marcadores moleculares de mandioca nesta região da Baixada Cuiabana.

1.1 Objetivos

O presente trabalho de dissertação apresenta os seguintes objetivos:

1.1.1 Objetivo geral

- Analisar a diversidade genética de variedades locais de *Manihot esculenta* mediante marcadores microssatélites em três comunidades da Baixada Cuiabana em Mato Grosso, Santo Antônio do Leverger, Cáceres e Porto Estrela.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a diversidade genética intra e inter populacional, bem como intravarietal de *Manihot esculenta* mediante marcadores moleculares SSR (microssatélites) nesta região.
- Determinar a distribuição da diversidade genética entre e dentro de roças, comu-

nidades e municípios baseando-se em padrões de diversidade genética utilizando marcadores moleculares SSR.

1.2 Hipóteses

- Espera-se encontrar alta variabilidade genética nas comunidades tradicionais da Baixada Cuiabana em Mato Grosso por estarem localizadas dentro da área considerada como centro de origem e domesticação da mandioca.
- Espera-se encontrar a maior parte da diversidade genética concentrada dentro de roças e dentro de comunidades, em função do sistema reprodutivo da espécie e do manejo aplicado pelos agricultores.
- Espera-se encontrar maior diferenciação genética dentro das etnovariedades e pouca diferenciação entre as etnovariedades, devido a redes de troca de manivas entre agricultores, levando conseqüentemente a nomeações diversas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Classificação e aspectos botânicos da espécie

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta monóica que pertence à classe Dicotyledoneae, família Euphorbiaceae, a qual é constituída por 7200 espécies e possui uma das tribos mais importantes, a Manihoteae, representada pelo gênero *Manihot* que se encontra distribuído desde o sudoeste dos Estados Unidos até a Argentina. O gênero *Manihot* possui centenas de espécies, onde a única cultivada comercialmente é a mandioca (*M. esculenta*) (OSPINA; CEBALHOS, 2002).

A família Euphorbiaceae caracteriza-se pelo desenvolvimento de vasos laticíferos, compostos por células secretoras chamadas galactósido, o que chega a produzir a secreção leitosa; existe uma alta variabilidade na arquitetura da planta dentro desta família, desde os tipos arbóreos (*Hevea brasiliensis*), até arbustivos (*Ricinus comunis*) (MARTÍNEZ et al., 2002). Todas as espécies do gênero *Manihot* podem se cruzar entre si, embora haja evidências de que na natureza se encontram reprodutivamente isoladas (NASSAR, 2001).

A mandioca é um arbusto perene, de ramificação simpodial e com variações na altura da planta que oscila entre 1 e 5 m, embora a altura máxima geralmente não exceda os 3 m; o caule é particularmente importante na mandioca, pois é o meio utilizado para a reprodução vegetativa ou assexuada da espécie; as folhas são simples e lobuladas como se observa na Figura 1, o número de lóbulos numa folha é variável e geralmente é ímpar, oscilando entre 3 e 9, o tamanho da folha é uma característica típica de cada variedade, bem como a cor da folha é uma característica varietal (CHAVARRIAGA-AGUIRRE; HALSEY, 2005).

Com relação à inflorescência, nem todas as variedades florescem; as flores são unisexuadas na mesma planta e geralmente na mesma inflorescência, a polinização da mandioca é cruzada, o que significa que cada indivíduo é naturalmente um genótipo com altos níveis de heterozigosidade; as flores possuem um fenômeno chamado protoginia, mas é possível, ocasionalmente que flores masculinas e femininas de distintos ráceros mas da mesma planta, abram de maneira simultânea e quando isso acontece é possível a ocorrência natural de autopolinização (RIOS, 2006).

Figura 1 – Morfologia da mandioca (*Manihot esculenta*) com detalhes das folhas jovens e adultas, das inflorescências, fruto e semente (KÖHLER, 1887)

2.2 Importância da mandioca

A mandioca constitui a base alimentar de mais de 800 milhões de pessoas em diversos países tropicais. Sua produção global em 2009 foi estimada em 242 milhões de toneladas. A Nigéria continua sendo o maior produtor do mundo, produzindo 45 milhões de toneladas, colocando a cultura da mandioca entre as principais explorações agrícolas desse país, sendo a maior parte cultivada por pequenos e médios produtores (FAOSTAT, 2009).

É cultivada em todos os Estados brasileiros e entre as culturas temporárias ocupa a quinta colocação em termos de valor da produção agrícola brasileira, sendo que o Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca. Estima-se que, nas fases de produção primária e no processamento de farinha e fécula, são gerados um milhão de empregos diretos e que o cultivo de mandioca proporciona receita bruta anual equivalente a 2,5 bilhões de dólares e uma contribuição tributária de 150 milhões de dólares; a produção que é transformada em farinha e fécula gera, respectivamente, receitas equivalentes a 600 milhões e 150 milhões de dólares (IBGE, 2003).

A mandioca constitui uma das fontes de energia mais importante nas regiões tropicais do mundo. É uma espécie que é cultivada desde o nível do mar até os 1800 metros de altura. As raízes são o principal produto econômico, mas a folha também tem um excelente potencial nutricional e são altamente utilizadas na África e Ásia, seja para a alimentação humana ou animal (OSPINA; CEBALHOS, 2002).

Em geral, a mandioca é um cultivo de usos múltiplos, onde as raízes são utilizadas de diferentes formas como na alimentação humana, por exemplo, no consumo direto como hortaliça. Do processamento das suas raízes se obtém a fécula, que é utilizada em produtos amiláceos como para insumos em diversos ramos industriais tais como o de alimentos embutidos, embalagens, colas, mineração, têxtil e farmacêutica. São nesses mercados que ocorrem a maior agregação de valor e se encontram as maiores perspectivas para o desenvolvimento da atividade mandioqueira (CEREDA, 2002).

A competitividade estabelecida pelas indústrias de processamento tem levado as unidades domésticas a se afastar cada vez mais do mercado industrial, mantendo este espaço “reservado” para unidades familiares e empresariais. Isto se deve às exigências de qualidade e profissionalização, importantes na estabilidade das especificações do produto que é uma exigência e uma necessidade das empresas transformadoras. Entretanto, as unidades domésticas continuam exercendo um papel fundamental na alimentação da população rural de baixa renda (SANTANA et al., 2008).

2.3 Origem e domesticação da mandioca

De acordo com Rogers e Appan (1973), o gênero *Manihot* contém 98 espécies, das quais um quinto são nativas da América do Norte, enquanto os restantes quatro quintos ocorrem na América central. Estes autores sugerem que a mandioca tenha sido originada da espécie *Manihot aesculifolia*.

Harlan e Dewet (1971) e Nassar (1978) identificaram a região central do Brasil como o principal centro de diversidade para *Manihot esculenta*, seguido de outros dois centros no sul do México e nordeste do Brasil.

De acordo com Hershey et al. (1994), a domesticação ocorreu em várias áreas, de modo simultâneo. Após o descobrimento da América, houve uma rápida dispersão dessa espécie. Os portugueses no século XVI levaram clones de mandioca para o continente africano, onde se desenvolveu com grande sucesso e hoje a África é considerada um centro secundário de diversidade. A partir daí, comerciantes e conquistadores levaram as espécies de mandioca para o sudeste asiático sendo introduzida no sul da Índia.

Colombo et al. (2000) apresentaram a relação genética entre a espécie *M. esculenta* e outras cinco espécies que ocorrem naturalmente no gênero, baseando a análise em marcadores moleculares AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplifica-

dos) e RADP (amplificação aleatoria de ADN polimórfico), observando que existia maior similaridade entre *M. flabellifolia* e *M. peruviana*, respeito à *Manihot esculenta* cultivada, sugerindo por conseguinte que a mandioca teria se originado das espécies *M. flabellifolia* e *M. peruviana*.

Já Nassar (2001) sugeriu que a domesticação da mandioca ocorreu no norte da Amazônia brasileira, levando em consideração os estudos sobre migração indígena desde a América do Sul até as Antilhas, principalmente de grupos Tupi e Guarani.

Os dados gerados pelos marcadores microssatélites e SNPs analisados por Olsen e Schall (1999), Olsen e Schaal (2001) e Olsen (2004) corroboram os achados de estudo filogeográficos onde se tem variação genética da cultura com um subconjunto do seus parentes selvagens específicos, sugerindo que *M. flabellifolia* é único progenitor da mandioca selvagem. Além disso, os dados de microssatélites confirmam que a mandioca é estreitamente relacionada com as populações de *M. flabellifolia* ocorrendo ao longo da fronteira sul da bacia Amazônica. Assim, esse ecótono sul é independentemente identificado como provável origem geográfica da domesticação da mandioca (Figura 2). Curiosamente, a evidência arqueológica do centro de Rondônia sugere desenvolvimento precoce de assentamentos agrícolas nessa região (MILLER, 1992).

Léotard et al. (2009) recentemente utilizaram o gene *G3pdh* para examinar o cultivo da mandioca numa área mais extensa. Os autores examinaram diversas espécies silvestres, e validaram os resultados de Olsen e Schall (1999), sugerindo fortemente que a mandioca teria sido domesticada a partir de *M. esculenta* ssp. *flabellifolia*, sendo que essa domesticação teria ocorrido nos Estados do Brasil no norte de Mato Grosso, Rondônia e Acre, e na área da fronteira com a Bolívia.

Como resultado da domesticação da mandioca chegamos a ter mudanças drásticas na espécie *M. esculenta* ssp. *flabellifolia* como desenvolvimento de raízes tuberosas com capacidade de armazenar altos conteúdos de carboidratos, e depois da domesticação inicial diferentes pressões evolutivas deram lugar a grandes grupos de variedades, como as bravas e as mansas pelo potencial cianogênico (McKEY; BECKERMAN, 1993).

2.4 Conservação da diversidade *on farm*

A diversidade genética refere-se à variação de genes dentro das espécies, ou seja, a variação hereditária dentro e entre populações de organismos; essa variação genética

Figura 2 – Distribuição geográfica das populações de *M. esculenta* ssp. *flabellifolia* e *M. pruinosa* identificadas por Olsen e Schaal (2001)

reside na sequência dos quatro pares de bases que compõem a molécula de DNA e, como tal, constituem o código genético (SPOONER et al., 2005).

A geração de nova variação genética ocorre continuamente em indivíduos com mutações cromossômicas e genéticas, organismos com reprodução sexual, propagadas por recombinação. A variação genética também é influenciada pela seleção, como consequências de fenômenos como alterações do gene e também nas frequências alélicas que influenciam na evolução das populações. Situações similares podem ocorrer por meio de seleção artificial (SPOONER et al., 2005).

As plantas domesticadas foram resultado de modificações de seus parentes silvestres, essas espécies foram levadas e adaptadas a novos ambientes chegando a ser dependentes dos agricultores, as quais são adequadas para satisfazer as necessidades e requerimentos humanos (FULLER, 2007). A diversidade genética é importante tanto para os agricultores individuais e as comunidades agrícolas, assim como para a agricultura em geral. Os agricultores individuais valorizam a diversidade entre e intra cultivares, em função da heterogeneidade dos solos e condições de produção, fatores de risco, demanda do mercado, consumo e diversidade de produtos que podem vir de uma mesma espécie de cultivo (BRUSH, 2000).

A manutenção da diversidade é uma das preocupações atuais da humanidade, e a perda de espécies silvestres esta crescendo alarmantemente, por isso é que se precisa da

intervenção humana para garantir a sua sobrevivência, pois a diversidade genética é a base do potencial evolutivo das espécies, para responder às mudanças do ambiente; esta torna-se um pilar essencial na conservação genética e a maioria da diversidade genética esta distribuída normalmente em fragmentos de habitats, reservas naturais, entre outros (FULLER, 2007).

Por esta razão, a caracterização e gestão da diversidade genética tem que ser considerada levando-se em conta a estrutura genética da população; por conseguinte conhecer a distribuição da diversidade entre e dentro populações de uma espécie é importante para a conservação, pois fornece orientações úteis para a preservação da diversidade genética dentro da espécie como um todo. Se a maior proporção da diversidade reside entre as populações, então as populações devem ser conservadas por conter a maior parte do nível de diversidade (HAMRICK; GODT, 1996). O parâmetro mais utilizado para medir a diversidade genética dentro das populações é a heterozigosidade esperada (NEI, 1973).

As populações de plantas domesticadas nos agroecossistemas tradicionais são modelos pertinentes para o estudo dos processos microevolutivos. Em primeiro lugar, as estruturas genéticas e o funcionamento ecológico próprio destas populações afetam os processos dentro deles. Em segundo lugar, as fontes de variação que geralmente escondem fenômenos de interesse na natureza se reduzem nesses sistemas de estudo (RIVAL; McKEY, 2008).

Temos um claro exemplo onde a mandioca foi selecionada em agroecossistemas, pela capacidade de armazenar amido nas raízes, e pela facilidade com que poderia ser propagada assexuadamente a partir de manivas (OLSEN; SCHALL, 1999; CARVALHO; SCHALL, 2001). Em contraste com os ancestrais selvagens, estes não possuem adaptações para reprodução vegetativa, a qual facilita a sua propagação clonal pelos agricultores. Antepassados selvagens da mandioca tinham seus órgãos de armazenamento subterrâneo como raízes, e as manivas não tinham a capacidade de enraizar; essa capacidade evoluiu durante a domesticação deste cultivar (RIVAL; McKEY, 2008).

A seleção natural e humana, em conjunto, atuam sobre a diversidade de mandioca através dos seguintes processos: (1) um sistema de cultivo global, que é altamente adaptado às pressões ambientais, (2) o conhecimento, categorização e valorização das diferenças varietais fenotipicamente expressas; e (3) incorporação de plantas reproduzidas sexualmente, o que estimula a diversidade intravarietal e, ocasionalmente, leva à criação de novas variedades, ou seja, novas categorias que são fenotipicamente distintas e recebem

um novo nome antes de ser multiplicadas. Pesquisas empíricas detalhadas e de análises interdisciplinares mostraram que a diversidade da mandioca, longe de ser estática, representa uma resposta dinâmica a uma gama de fatores seletivos ambientais e humanos (RIVAL; McKEY, 2008).

A amplificação da variabilidade genética na roça é auxiliada ainda por mais dois fatores integrados, a biologia das sementes e o sistema de coivara adotado pela maioria dos caboclos, índios e caiçaras, em que as roças são abandonadas após o solo ter-se esgotado, e retomadas após vários anos, quando as capoeiras já restauraram a fertilidade (MARTINS; OLIVEIRA, 2009).

A mandioca tem frutos deiscentes, que expõem as sementes a distâncias médias de seis metros, podendo chegar a 14 ou 15 frutos em média. A dispersão das sementes por explosão está completamente fora do controle dos agricultores, que não as usam nem colhem, pois tem uma direção aleatória (PUYOL et al., 2005).

Em síntese, a amplificação da variabilidade da mandioca está relacionada a um conjunto de mecanismos básicos. O primeiro é essencialmente cultural, e consiste na simples introdução ou troca de variedades cultivadas dentro da comunidade e entre comunidades, como já descrito por antropólogos em diversas comunidades, e a invasão de espécies selvagens, possibilitado pelo sistema de coivara, introduzindo mais variabilidade primária no âmbito da roça (AMOROZO, 2000).

A existência de todo esse material dentro da roça, mais o padrão de arranjo espacial das plantas, permitem que tanto a hibridização inter como a intraespecífica, que são os mecanismos-chaves, produzam recombinantes, ampliando a variabilidade genética (NASSAR, 2001). Como essa variabilidade está contida nas sementes produzidas, ela fica, num primeiro momento, armazenada no banco de sementes, e é adicionada no ciclo agrícola seguinte, depois de permanecer dormente no solo, enquanto a capoeira se regenera; as sementes do banco se enquadram em três tipos: as resultantes de hibridação interespecífica, as resultantes de hibridação intraespecífica (entre as variedades) e as resultantes de autofecundação (SAMBATTI et al., 2001).

Quando as sementes finalmente germinam, elas sofrem tanto pressão de seleção natural como artificial, ambas intensas. Os dois primeiros tipos de sementes apresentam heterose, ou vigor de híbrido, enquanto o terceiro apresenta forte depressão por endogamia, típico de plantas alógamas. As plantas endogâmicas são geralmente fracas e pouco com-

petitivas nos primeiros estágios de vida; geralmente, nesse estágio, as roças precisam ser carpidas até três vezes para eliminar os competidores; as plantas endogâmicas que sobrevivem às primeiras etapas são geralmente eliminadas pelo homem na fase adulta, pois não dão manivas boas. As plantas que sobrevivem até a idade adulta, inclusive as heteróticas, passam então pelo crivo da seleção perceptiva, isto é, só são escolhidas para propagação vegetativa, e portanto, incorporadas à coleção de variedades, se apresentam alguma característica distintiva e nova (McKEY et al., 2010).

É interessante notar que ele exerce claramente uma seleção consciente, que é feita no momento da colheita desse material, quando ele separa as manivas para o plantio no próximo ciclo; a variabilidade nova, portanto, é fixada integral e imediatamente pela propagação vegetativa, dando origem a novas variedades. Note-se que a reprodução vegetativa está ausente em todas as espécies selvagens do gênero *Manihot*, e evoluiu durante a domesticação; o surgimento de propagação vegetativa no cultivar de *M. esculenta* implicou basicamente a mudança da estrutura morfológica do caule e dos ramos e basicamente com a capacidade de enraizamento das manivas, tendo como outra característica importante a capacidade de acúmulo de carboidratos nas raízes, caracteres que podem ser usados como diagnósticos na identificação do cultivar (SAMBATTI et al., 2001).

2.5 Importância nutricional

A raiz da mandioca é uma fonte muito boa de energia e carboidratos, assim como também de cálcio, fósforo e ácido ascórbico; além disso é uma planta cianogénica, ou seja sintetiza ácido cianídrico (HCN). Os glucosídeos cianogénicos são tóxicos porque produzem HCN por degradação enzimática. O ácido cianídrico se forma quando se cortam ou trituram as plantas ou as partes que contém glucosídeos e a enzima linamarase. Na mandioca foram identificados os glucosídeos Linamarina e Lotaustralina, componentes do cianeto (FRETES, 2010). Recentemente, por meio de engenharia genética e melhoramento de culturas tradicionais, encontraram-se em desenvolvimento projetos para aumentar o teor de proteínas e vitaminas (MONTAGNAC et al., 2009).

Atualmente, vêm recebendo amplo destaque entre pesquisadores e produtores de mandioca no Brasil e no mundo, acessos de mandioca popularmente conhecidos como mandiocas açúcaradas ou mandiocabas, que armazenam açúcares livres em suas raízes de reserva e não somente amido, como a grande maioria dos acessos de mandioca cul-

tivados comercialmente (CARVALHO et al., 2004). Assim, a mandioca que sempre foi cultivada em função de suas raízes tuberosas ricas em amido e/ou de sua parte aérea rica em proteínas, apresenta agora novas possibilidades de utilização na indústria (VIEIRA et al., 2011). Esses acessos diferenciados podem vir a ser empregados na produção de glicose sem hidrólise do amido, na produção de amido com variabilidade na proporção amilose/amilopectina, na produção de amido do tipo glicogênio, na produção de álcool (combustível e para indústria de cosméticos), na siderurgia, entre outras utilidades (CARVALHO et al., 2004).

Das raízes da mandioca se obtém dois tipos de produtos, que são mandioca para farinha e amido, a farinha da mandioca é utilizada na alimentação humana, já o amido de mandioca é utilizado em indústrias alimentícias e não alimentícias como para a fabricação de plásticos entre outros; o amido é habitualmente utilizado como componente em três destacados segmentos industriais: alimentício, químico e papeleiro, e pode também ser utilizado na indústria papeleira como branqueador do papel, e como aglomerante de fibras de celulose (FRETES, 2010).

2.6 Marcadores moleculares

Tradicionalmente, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, cujos fenótipos são de fácil identificação visual, o que contribuiu significativamente ao desenvolvimento de mapas genéticos. No entanto, o baixo número de marcadores morfológicos e a dificuldade de interferência epistática ou ambiental limitam sua utilização; a revolução neste plano se iniciou com o descobrimento e utilização de marcadores isoenzimáticos, seguindo-se os moleculares. O número de marcadores genéticos disponíveis foi ampliado e a aplicação da técnica se expandiu praticamente a todas as espécies de plantas (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Um marcador molecular é qualquer fenótipo molecular oriundo da expressão de um gene ou de um segmento específico de DNA, que pode ser detectado e a sua herança monitorada. O marcador molecular recebe o nome de marcador genético quando seu comportamento se baseia nas leis básicas da herança mendeliana (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Um marcador de DNA é simplesmente um ponto de referência num cromossomo, que pode ou não corresponder a um gene (RAJEEV et al., 2007). Ao longo das últimas

décadas se tem introduzido uma nova geração de marcadores baseados em DNA os quais estão atuando como ferramentas versáteis, e estão sendo modificados constantemente para melhorar a sua utilidade. A descoberta da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Figura 3), faz parte desse esforço para melhorar os marcadores moleculares, pois a facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos. Existem também outras técnicas que permitem obter um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares e cobrir a totalidade do genoma de um organismo como, por exemplo, as enzimas de restrição, a separação eletroforética dos fragmentos de DNA, sondas marcadas e as hibridações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Figura 3 – Reação de Polimerase em Cadeia: PCR (VIERSTRAETE, 1999)

2.6.1 Marcadores moleculares microsatélites

Nos últimos anos, marcadores moleculares têm sido utilizados para uma variedade de aplicações, incluindo o exame das relações genéticas entre os indivíduos, mapeamento de genes úteis, construção de mapas de ligação, a seleção assistida por marcadores e retrocruzamentos, estudos de genética populacional e filogenética (RAJEEV et al., 2007). Entre os marcadores moleculares disponíveis temos os microsatélites, que são repetições em tandem de um a seis nucleotídeos. Este marcador também é conhecido com o nome de sítios microsatélites de sequência etiquetada (STMS) ou polimorfismo de repetições de sequências simples (SSR) (LITT; LUTY, 1989).

Esses marcadores têm ganhado considerável importância em genética e melhoramento de plantas, devido a muitos atributos desejáveis da genética incluindo hipervariabilidade, natureza multialélica, herança codominante, reprodutibilidade, abundância rela-

tiva, a cobertura do genoma extensa incluindo genomas de organelas, localização cromossômica específica e receptividade à automação e genotipagem de alto rendimento (VARSHNEY et al., 2005). Alto grau de variação alélica é revelada por marcadores microssatélites. Os SSRs estão sendo amplamente utilizados na análise do genoma de plantas. Microssatélites podem ser desenvolvidos diretamente a partir de bibliotecas de DNA genômico ou a partir de bibliotecas enriquecidas de microssatélites específicos. Alternativamente, microssatélites também podem ser encontrados buscando bases de dados públicos, como o GenBank (KALIA et al., 2010).

Os SSR hoje constituem a classe de marcador mais polimórfico disponível em organismos eucariotos, estas sequências são mais freqüentes, arbitrariamente melhor distribuídas e formam um loco genético muito mais polimórfico que os VNTRs (Variable Number Tandem Repeat); os microssatélites se detectam amplificando o fragmento de DNA que contém as sequências repetidas com um par de iniciadores que flaqueiam essa região (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Cada microssatélite, independentemente do elemento repetido, constitui um loco genético altamente variável, cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As vantagens que possuem é que têm mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo ou PIC, suas regiões flanqueantes são altamente conservadas o que permite desenvolver iniciadores com grande especificidade aos locos; são muito freqüentes e estão distribuídos relativamente espaçados com uniformidade ao acaso, o que permite a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto, e a maioria dos locos são seletivamente neutros o que os faz compatíveis com os postulados das teorias de genética de populações (SHARMA et al., 2008).

Atualmente, sabe-se que os genomas, particularmente os eucariotos são mais inteligentes do que se pensava anteriormente. Uma grande porção de DNA não codificante e DNA repetitivo que anteriormente era considerado como lixo agora está sendo reconhecido como sequências com funções específicas, que estão estrategicamente localizadas e cuidadosamente selecionadas durante a evolução e divergência; os microssatélites representam tais estruturas que podem mesmo constituir partes dos genes e nele regular uma série de processos biológicos (VARSHNEY et al., 2005). Esforços substanciais têm sido feitos para entender suas localizações genômicas associadas a funções e ao modo

da sua evolução. Comparações do genoma agora são possíveis para esses estudos, especialmente após a disponibilidade de grande quantidade de dados de sequência genômica. Tais comparações facilitam a compreensão da conservação e os padrões de divergência de microssatélites a mais longas escalas evolutivas, isso ajudará a desenhar um consenso sobre os modos de evolução e tendências evolutivas que determinam a variabilidade de microssatélites e funcionalidade nos genomas (GROVER; SHARMA, 2011).

Os SSRs são úteis como marcadores moleculares, porque seu desenvolvimento é barato, eles representam genes transcritos e uma função putativa que muitas vezes pode ser deduzida por uma pesquisa de homologia, porque eles são derivados de transcrições. Eles são úteis para ensaio de diversidade funcional em populações naturais ou coleções de germoplasma; estes marcadores são valiosos por causa de seu alto nível de transferência a espécies afins, e muitas vezes podem ser usados como marcadores âncora para mapeamento comparativo e estudos evolutivos. Eles foram desenvolvidos e mapeados em várias espécies de cultivos e podem ser úteis para a seleção assistida por marcadores, especialmente quando os marcadores residem nos genes responsáveis por uma característica fenotípica (VARSHNEY et al., 2005).

2.7 Diversidade genética em mandioca com marcadores microssatélites

Para mandioca, existe um grande número de iniciadores microssatélites publicados por Chavarriaga-Aguirre et al. (1998), Mba et al. (2001) e Sraphet et al. (2011). Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) caracterizaram e isolaram 14 locos microssatélites em mandioca, analisando mais de 500 acessos, sendo que os valores de heterozigosidade variaram de zero a 0,88 e o número de alelos variou de 1 a 15. Aproximadamente 80% dos microssatélites detectaram um ou dois alelos por acesso, sugerindo um baixo grau de duplicação de locos de microssatélite.

Mba et al. (2001) desenvolveram 172 locos microssatélites. Destes, 95% são repetições dinucleotídicas e 21% repetições compostas. Mais recentemente, Sraphet et al. (2011) desenvolveram um total de 640 iniciadores SSR a partir de uma biblioteca enriquecida de DNA genômico e 1500 locos a partir de sequências EST-SSR (sequence tag-simple sequence repeat), obtidas em dados do Genbank.

Estudos de diversidade genética de mandioca utilizando microssatélites têm sido explorados em países tropicais, tais como os conduzidos por Beeching et al. (1993); Her-

shey et al. (1994); Fregene et al. (2003); Mkumbira et al. (2003); Asante e Offei (2003); Mkumbira et al. (2003); Elias et al. (2004); Zacarias et al. (2004); Lokko et al. (2006); Moyib et al. (2007); Kizito et al. (2007); Hurtado et al. (2008); Rocha et al. (2008); Raji et al. (2009); Rojas et al. (2011). No Brasil, diversos estudos têm sido conduzidos na avaliação da diversidade genética de variedades locais ou etnovariedades, tais como os de Mühlen (1999); Mühlen et al. (2000); Carvalho e Schaal (2001); Peroni e Hanazaki (2002); Costa et al. (2003); Peroni et al. (2007); Ferreira et al. (2007); Vieira et al. (2009); Siqueira et al. (2009, 2010); Alves-Pereira et al. (2012); Oliveira et al. (2012), entre outros. Destes estudos, o único que avaliou variedades locais de Mato Grosso foi Siqueira et al. (2009), onde foram avaliadas dez etnovariedades do município de General Carneiro, os quais foram comparados com outras variedades locais originárias de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Amazonas. Curiosamente, os acessos de Mato Grosso mostraram-se mais divergentes com relação aos demais acessos avaliados.

A conservação de germoplasma de mandioca é essencial para reduzir a erosão genética das espécies e diversidade genética disponível para ajudar a melhorar a cultura. Na mandioca esta erosão é principalmente devido à expansão das fronteiras agrícolas, o avanço da urbanização, e aos estresses bióticos e abióticos e, em menor medida, pela substituição das variedades tradicionais por variedades melhoradas (FUKUDA et al., 1996).

2.8 Estrutura genética em populações de plantas

A estrutura genética de uma população é conhecida por afetar a dinâmica evolutiva de alelos nas populações, a compreensão dos padrões de subdivisão da população, sendo muitas vezes um primeiro passo para aprender sobre as forças evolutivas que afetam uma espécie (HUELSENBECK et al., 2011).

O conhecimento sobre a diversidade de germoplasma e as relações genéticas entre os materiais de reprodução poderia ser uma ajuda inestimável em estratégias de melhoramento de culturas. Uma série de métodos estão atualmente disponíveis para a análise de diversidade genética em acessos de germoplasma, linhagens e populações (BALLOUX; LUGON, 2002).

O termo estrutura genética, segundo Loveless e Hamrick (1984), é uma distribuição não casual de alelos ou genótipos no tempo e no espaço. Esta pode apresentar-se estrutu-

rada especialmente em diferentes escalas, tais como: populações, sub populações ou entre indivíduos vizinhos devido aos sistemas de reprodução e dispersão, e também da história de vida das espécies, gerando um maior grau de parentesco dentro dos grupos do que entre os grupos.

Estruturação genética reflete o número de alelos trocados entre populações e tem importantes conseqüências sobre a composição genética dos próprios indivíduos; compreender o fluxo de genes e seus efeitos é fundamental para muitos campos de investigação, incluindo genética de populações, ecologia de populações e biologia da conservação. A troca de genes entre populações homogeniza freqüências alélicas entre populações e determina os efeitos relativos de seleção e deriva genética (BALLOUX; LUGON, 2002).

Existem variados métodos estatísticos que permitem caracterizar a estrutura genética das populações naturais, mediante marcadores moleculares e quando utilizamos marcadores moleculares codominantes é possível utilizar diferentes parâmetros genéticos que nos ajudam a entender a estruturação de uma população; na estimativa da riqueza alélica levando-se em conta o número médio de alelos por loco e a porcentagem de loci polimórficos.

Esta estimativa é sensível à presença ou ausência de alelos distintos ou raros (menos de 5% de freqüência) numa população; a porcentagem de loci polimórficos em uma população é uma estimativa aproximada da variação genética, uma vez que esteja sujeita a um grande erro de amostragem do genoma; esta estimativa é confiável apenas quando um grande número de locos é amostrado (ZONNEVELD et al., 2012). A uniformidade do alelo ou freqüência genotípica é contabilizada pelas médias de heterozigosidade média observada, heterozigosidade esperada e número efetivo de alelos; a estratégia de amostragem, tamanho e distribuição de uma amostra de de uma população, afeta a probabilidade de alelos raros da amostragem (LOPEZ; FULTON, 2004). A riqueza alélica é uma medida direta da diversidade genética que utiliza-se comumente em estudos baseados em marcadores moleculares, que tem por objetivo a seleção das populações para a conservação (ZONNEVELD et al., 2012).

Outro parâmetro utilizado para quantificar a variação genética, é a freqüência alélica, que em si é a medida da freqüência relativa de um alelo em um loco genético em uma população, sendo geralmente expresso como uma proporção ou uma porcentagem. Em genética de populações, as freqüências alélicas mostram a diversidade genética de uma população

de espécies ou equivalente a riqueza do seu patrimônio genético (LOPEZ; FULTON, 2004). As frequências de todos os alelos de um determinado gene, muitas vezes são representadas graficamente em conjunto como um histograma de distribuição de frequência do alelo. O cálculo da frequência alélica é dado por:

$$P(A) = \frac{2(AA) + (Aa)}{2n}.$$

Ou seja, duas vezes o número de genótipos homozigotos com esse alelo (porque cada homozigoto tem duas cópias do mesmo alelo), mais o número de genótipos heterozigotos com esse alelo (porque os heterozigotos têm somente uma cópia de um alelo em particular), dividido por duas vezes o número total de indivíduos na amostra (porque cada indivíduo porta dois alelos por loco) (LOPEZ; FULTON, 2004).

Outro índice importante na análise de estruturação de uma população com marcadores moleculares é o conteúdo de informação polimórfica, o qual foi introduzido por Bostein em 1980, como um indicador de qualidade de um marcador em estudos de cartografia genética, mas na atualidade é utilizado para valorização da qualidade de um marcador para estudos genéticos, pois reflete o polimorfismo detectado. O valor do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) dá uma estimativa do poder discriminatório de um loco tomando como referência não só o número de alelos. Os valores do PIC estão em um parâmetro de 0 (monomórfico) a 1 (altamente discriminativo, com muitos alelos com frequência similar). Por exemplo, um loco que revela cinco alelos, mas onde um deles é encontrado com frequência muito alta (exemplo Freq. = 0,9), tem menor capacidade discriminatória (PRASAD et al., 2000).

O PIC estima o poder discriminatório de um loco, não só considerando o número de alelos que estão expressos, se não também as frequências relativas dos alelos. Os valores de PIC superiores a 0,5 são informativos, os compreendidos entre 0,25 e 0,5 são medianamente informativos e os inferiores a 0,25 são poucos informativos (LOPEZ; FULTON, 2004). Para determinar o PIC utiliza-se a seguinte fórmula baseado no valor de heterozigosidade:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n (P_i)^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1}^n (P_i)^2 (P_j)^2$$

Onde: P_i é a frequência do i - ésimo alelo do número total de alelos e o número dos diferentes alelos em uma amostra.

Uma das melhores valorizações de variação genética de uma população se define como, a proporção de indivíduos heterozigotos para um loco em uma população. Segundo Weir (1996), a heterozigosidade indica que o conhecimento da frequência de heterozigotos é importante em estudos de diversidade, na medida em que cada heterozigoto leva diferentes alelos, o qual mostra a existência de variação genética em uma população (LOPEZ; FULTON, 2004). Geralmente calculam-se a heterozigosidade observada e esperada. A primeira é a proporção de indivíduos heterozigotos observados em uma amostra, e é calculada a partir dos genótipos encontrados na população para um loco ou para todos os locos. A heterozigosidade esperada se refere à diversidade genética e é definida como a probabilidade de que dois alelos selecionados aleatoriamente de um indivíduo qualquer sejam diferentes, sendo calculada a partir das frequências alélicas.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2,$$

em que p_i^2 é a frequência do i -ésimo alelo, $\sum_{i=1}^k$ o somatório de k alelos em um i -ésimo locus.

A análise de estrutura genética pode ser calculada também mediante as estatísticas F de Wright, também conhecida como índices de fixação que permitem medir a divergência genética entre médias de heterozigosidade das populações (índice de fixação entre populações ou F_{ST}), assim como também o grau de redução da heterozigosidade dentro de uma população (índice de fixação dentro de uma população ou F_{IS}) e a diminuição global de heterozigosidade (índice de fixação para uma população F_{IT}) com relação a uma população total (LOPEZ; FULTON, 2004).

Outros parâmetros análogos a F_{ST} foram definidos por outros autores sobre a base de supostos alternativos sobre o modelo de evolução e as conseqüentes modificações no algoritmo. Nei (1973) sugeriu outra estatística, Gst que utiliza a informação de vários loci simultaneamente. Gst é calculada a partir das frequências dos alelos em lugar das frequências do genótipo (supondo o equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as subpopulações); Gst mede a quantidade proporcional de variação entre as subpopulações em comparação com a população total e não especifica a identidade dos alelos implicados. Quando as subpopulações parecem similares, Gst é parcial e dá lugar a uma estimativa do grau de sub estruturação (MOHAMMADI; PRASANNA, 2001).

2.8.1 Análises de distribuição espacial

Um sistema de informação geográfica (GIS) é um sistema computarizado de armazenamento, processamento e recuperação de informação que tem hardware e software especialmente desenhados para manejar dados espaciais geograficamente referenciados e a informação dos atributos correspondentes. Em outras palavras, um GIS é um sistema de base de dados, dedicado ao manejo simultâneo de dados espaciais em forma gráfica, e relacionados com adjuntos lógicos e dados não espaciais (HIJMANS et al., 2004).

A tecnologia GIS tem aplicações óbvias no manejo de recursos naturais, informação sobre riqueza de espécies, endemismos, redução de habitat, áreas protegidas, fontes de água, pressão humana, e o meio ambiente físico pode ser mapeado e combinado a mapas derivados de sensores de *pool* de genes e sensores meio ambientais, para cidades ou regiões autônomas de um país. Existem sistemas hoje como os SIG (sistemas de informação geográfica) para o manejo simultâneo de dados espaciais em forma gráfica e dados não espaciais, relacionados com adjuntos lógicos (HIJMANS, 2003).

Os GIS são aplicados, além de outras utilidades, em manejo de recursos naturais. Dentro deste tema foi desenvolvido um programa muito útil, DIVA GIS, com o qual se fazem análises de base de dados de coleções biológicas como bancos de germoplasma e herbários para elucidar os padrões genéticos, ecológicos e geográficos na distribuição de espécies cultivadas e nativas. Entre as funções analíticas do DIVA-GIS incluem-se o mapeamento de riqueza e diversidade de espécies baseados em dados de marcadores moleculares. Com esta função se analisaram dados de presença e ausência utilizando as distâncias genéticas calculadas com os índices de Jaccard, Nei e Li, Sokal e Michener (HIJMANS et al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição das comunidades em estudo

O presente trabalho foi desenvolvido com acessos de mandioca cultivada no Estado de Mato Grosso por pequenos produtores rurais nos municípios de Cáceres (Comunidade de Santo Antônio, Comunidade Cidade Nova, Comunidade de Junco, Bairro Jardim do Trevo, Bairro Boa Esperanza, Bairro Santo Antônio), município de Santo Antônio do Leverger (Comunidades de Varguinha e Barreirinho) e o município de Porto Estrela (Comunidade de Luzia e Assentamento Banco da Terra), a área do estudo encontra-se numa transição entre os biomas de Cerrado e Pantanal (Figura 4). A cultura de mandioca é plantada em lavouras de 0,5 a 30 ha, com produtividade média de 13,2 t/ha. A produção é destinada à alimentação animal, subsistência da família, uma grande parte para indústria artesanal da farinha e outra destina-se ao consumo *in natura* ou de congelados nos mercados urbanos, não havendo no Estado indústria de grande porte de farinha (SIMIÃO et al., 2003).

Na área de estudo, comunidades tradicionais, fazendas de gado e, mais recentemente, chácaras de veraneio, dividem o espaço compreendido entre o campo-fora (cerrado) e a beira-rio (margens do Rio Cuiabá). As famílias mais antigas, que se estabeleceram há mais de um século no local, ainda desenvolvem, como principais atividades econômicas, a agricultura em pequena escala, a pesca e a fabricação de farinha de mandioca e rapadura para auto-consumo e comercialização. A entrada e o estabelecimento de moradores provenientes de outras áreas se intensificou a partir das duas últimas décadas, ocupando as terras de sesmaria, que eram usadas comunalmente pelas populações locais. Tais mudanças, em boa parte, foram reflexo das políticas governamentais de colonização e ocupação do norte e centro-oeste do país. Na última década, a exploração turística intensificou-se na região, trazendo uma expansão modesta no setor de serviços, e abrindo algumas oportunidades de emprego para as gerações mais novas (AMOROZO, 2000).

Apesar das grandes transformações sofridas pelo Estado de Mato Grosso nas últimas décadas, encontram-se ainda, na Baixada Cuiabana, comunidades que praticam agricultura de pequena escala, entre elas, algumas que se dedicam à produção de mandioca, sendo esta utilizada principalmente como farinha, seguida do uso de mandioca de mesa. Essa região é um local onde a área cultivada com mandioca poderia ter um aumento

expressivo, caso fossem oferecidos incentivos à produção e industrialização, bem como apoio na comercialização da produção. No entanto, a área total cultivada com mandioca representa apenas 7,3% da área total dos imóveis até 200 hectares (SIMIÃO et al., 2003).

Em pesquisas anteriores, como a desenvolvida por Amorozo (1996) no município de Santo Antonio do Leverger, (15°51'56"S; 56°04'36"O), constatou-se que existe um intercâmbio de etnovarietades de mandioca, entre agricultores de diferentes comunidades e até entre diferentes municípios. O enfoque na região é importante quando se trata de entender a manutenção do acervo de variedades por agricultores de pequena escala, porque a entrada de novas variedades ou a reintrodução de variedades antigas que se perderam, a partir de contatos com agricultores de áreas próximas, é uma das formas de tamponar a perda das variedades existentes (Louette, 2000; Amorozo, 2000).

Assim, para o presente trabalho escolhemos populações rurais em transição, que vêm perdendo suas características tradicionais, por interação intensa com núcleos urbanos, não continuidade das atividades locais pelas gerações mais jovens, aprofundamento da dependência do mercado, etc.; populações rurais tradicionais propriamente ditas; e populações não tradicionais (comerciantes em mercados urbanos, bairros em periferia de cidades), no âmbito da Baixada Cuiabana.

3.2 Genótipos de mandioca

Neste trabalho foram avaliados 211 acessos de mandioca, coletados em 40 roças de 10 comunidades, em três municípios da Baixada Cuiabana: Cáceres, Santo Antônio do Leverger e Porto Estrela. Os acessos foram coletados em forma de manivas, as quais foram plantadas no campo experimental do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Figura 5), de onde se coletaram as folhas jovens inseridas em microtubos contendo gel CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio, numa proporção de 15 % CTAB, 6 M NaCl) para extração de DNA (BHATTACHARJEE et al., 2009), para a análise molecular com marcadores microsatélites. Essa análise molecular foi realizada no Laboratório da Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada (LEEGA) do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Parte do material avaliado foi coletado nas próprias roças dos agricultores, inserindo-se as folhas jovens recém coletadas em microtubos de 1,5 mL, contendo um gel de CTAB, conforme metodologia descrita no próximo sub-item. Esses microtubos foram acondicionados em isopores e transportados ao Laboratório LEEGA para as análises.

Figura 4 – Municípios de Mato Grosso onde foram coletados acessos de mandioca (*Manihot esculenta*)

3.3 Extração de DNA

As folhas coletadas em gel de CTAB foram armazenadas a -4°C . Para que a ação do gel seja otimizada, torna-se necessário que a extração ocorra após sete dias de armazenamento no gel CTAB a -4°C (BHATTACHARJEE et al., 2009).

Após este período, o excesso de gel presente nos fragmentos de tecido vegetal foi excluído com auxílio de papel toalha. Em seguida as folhas foram submetidas à maceração com tampão STE [0,13 mg de Sacarose; 45 μL de Tris - HCL (1M); 150 μL de EDTA (0.5M), completando-se com H_2O destilada para o volume final de 1,5 mL] gelado, o que auxilia na retirada do cloreto de sódio contido no gel.

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987). O macerado foi transferido para um tubo de 1,5 mL e em seguida centrifugado à velocidade de 4 mil rpm por 10 min. Após esse procedimento o sobrenadante foi descartado. No

Figura 5 – Campo experimental de mandioca (*Manihot esculenta*) no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)

mesmo tubo foram acrescentados 0,8 mL do tampão de extração [30mM EDTA pH 8,0, 0,1M Tris-HCL pH 8,0, 1,2M NaCl, 3% CTAB, adicionando-se 2- B-mercaptoetanol ao 2% imediatamente antes do uso]. Os tubos foram encubados por 1h em banho-maria à 65°C, e posteriormente homogeneizados. Foi adicionado 0,5 mL de uma mistura que consiste em 24 partes de clorofórmio em 1 parte de álcool isopropílico (24:1). Esse material foi centrifugado a 8000 rpm por 10 min, na qual foi retirado 0.5 mL do sobrenadante, transferindo-se para novo tubo. Foi adicionado novamente 0,5 mL da solução 24:1, agitando-se o tubo, que foi posteriormente centrifugado a 8 mil rpm durante 10 minutos. Foram transferidos 0,4 mL do sobrenadante para novos tubos, adicionando-se 0,35 mL de isopropanol pré-esfriado à -20°C. O material foi mantido por 1 hora à temperatura de -5°C no freezer. Após este período o material foi centrifugado a 8 mil rpm por 10 minutos, e em seguida retirado todo o sobrenadante tendo o cuidado de não jogar o *pellet* formado. No *pellet* formado foi acrescentado etanol a 70% para lavagem e como etapa final o sobrenadante foi retirado e o pellet ficou secando por aproximadamente 12 horas. O pellet foi suspenso em solução tampão TE, no qual foi adicionado 50 μ L de TE mais 5 μ L de RNase em cada tubo (10 ug/ μ L). Os tubos foram colocados em banho-maria por 30 minutos à 37°C, para posteriormente serem armazenados no freezer.

3.4 Quantificação de DNA

Para calcular a quantidade de DNA extraído realizou-se eletroforeses horizontal em geis de agarose a 1%. Para a visualização das bandas foi utilizado SYBR GREEN (*Life Technologies*) e para a quantificação das amostras de DNA foram utilizadas Lambdas padrões (5, 20, 40, 80 e 160 ng) (*Life Technologies*).

No carregamento das amostras no gel foi utilizado o tampão de carregamento SALB 2X, 5 μ L por amostra de DNA, o qual tem a finalidade de incrementar a densidade da amostra, para assegurar que o DNA seja depositado uniformemente no poço, assim não só facilita o carregamento se não também serve como um padrão de corrida referencial, devido às cores do tampão que são visíveis durante a corrida eletroforética.

A corrida eletroforética foi realizada em cuba contendo tampão TBE 1% a uma voltagem de 90 V durante o período de 45 minutos. Uma vez terminado o tempo de corrida eletroforética, foi visualizado com um captador de imagens digitais, um fotodocumentador contendo um transluminador UV modelo Z-21 (Figura 6).

Figura 6 – Quantificação de DNA

3.5 Amplificação dos locos microssatélites

Para a amplificação dos iniciadores de microssatélites, foi preciso padronizar um protocolo de amplificação segundo as condições do Laboratório da Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada (LEEGA) do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

As reações de amplificação foram padronizadas num volume final de 10 μ L contendo; 10 ng de DNA genômico, *TAQ-Polimerase* (0,5 U); Tampão (10X); MgCl₂ (1,5mM); iniciador (primer) F (0,12 pmoles); iniciador R (0,12pmoles); dNTP (0,25 mM) e H₂O Milli-Q em cada tubo, que fornece os reagentes necessários para a reação (Mix).

Quatorze iniciadores pré-estabelecidos por Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) e Mba et al. (2001) foram utilizados neste estudo (Tabela 1). Esses iniciadores já foram utilizados em outros estudos com mandioca (FREGENE et al., 2003, LOKKO et al., 2006, KIZITO et al., 2007, SIQUEIRA et al., 2009, SIQUEIRA et al., 2010). No protocolo de amplificação foram utilizadas as seguintes temperaturas e ciclos, variando-se a temperatura de anelamento de cada iniciador, 94°C por 1 minuto, seguido de 33 ciclos incluindo 94°C por 30 segundos, 55°C ou 50°C de acordo com a temperatura específica de anelamento de cada primer por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma fase de extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.6 Eletroforese do produto amplificado

3.6.1 Preparação do gel de poliacrilamida

Os produtos de amplificação foram separados em géis desnaturantes de poliacrilamida mediante eletroforese vertical em um sistema de seqüenciamento modelo S3S. Primeiro se fez limpeza dos dois vidros com álcool e papel absorvente antes de começar o tratamento dos vidros, a placa menor foi impregnada com uma solução aderente (5 μ L de ácido acético glacial, 5 μ L de silano adesivo e 1,5 μ L de álcool absoluto), e a placa grande foi impregnada com repelente (Dimethyldiclorosilan). Esse tratamento dos vidros é feito para que o gel de acrilamida só fique impregnado em uma placa só (na placa menor).

Depois de 30 minutos se procedeu à montagem das placas, e para a elaboração do gel, utilizando-se uma solução de poliacrilamida (70 μ L de acrilamida 7% uréia 7M, 360 μ L de persulfato de amônio a 10% e 36 μ L de TEMED).

O persulfato de amônio em solução se dissocia formando dois íons de sulfato com um radical livre que ativa a acrilamida induzindo uma quebra do enlace (C=C) para se converter também em um radical livre, que ao se encontrar com a outra molécula se une a essa formando um polímero linear de acrilamida. O TEMED é um catalizador de reações de modo que a polimerização não teria lugar sem sua presença.

A seguir foram colocadas os pentes respectivos, para que o gel possa ser utilizado para a corrida eletroforética, recomendando-se esperar pelo menos duas horas para sua polimerização.

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores (forward/reverse) que foram utilizados para a análise dos microssatélites e seus respectivos tamanhos (pb) para a análise de acessos de mandioca de três municípios da Baixada Cuiabana (* Mba et al. (2001), ** Chavarriaga-Aguirre et al. (1998))

Nome do indicador	Sequencia 5' a 3' do indicador	Tamanho observado (pb)
SSRY 8*	AGTGGTTTGTGAGAAGACTGGTGA TTTCCAAAATGGAACCTCAAA	282-298
GA 12**	GATTCCTCTAGCAGTTAAGC CGATGATGCTCTTCGGAGGG	138-150
SSRY 21*	CCTGCCACAATATTGAAATGG CAACAATTGGACTAAGCAGCA	160-192
SSRY 27*	CCATGATTGTTTAAGTGGCG CCATTGGAGAACTTGGCAAC	265-280
SSRY 28*	TTGACATGAGTGATATTTTCTTGAG GCTGCGTGCAAACTAAAAT	100-120
SSRY 35*	GCAGTAAAACCATTCCTCCAA CTGATCAGCAGGATGCATGT	277-285
SSRY 40*	TGCATCATGGTCCACTCACT CATTCTTTTCGGCATTCCAT	220-238
SSRY 43*	TCAGACGTTGATACCTCACTTCA CCAGAGCATGGTCTTTTCTGA	236-254
SSRY 47*	GGAGCACCTTTTGCTGAGTT TTGGAACAAAGCAGCATCAC	235-256
SSRY 126*	AATGGATCATGTTCAATGTCTTC TTGAAATACGGCTCAAGCTC	180-217
SSRY 141*	TCCAAAATCTTGGTCATTTTGA TGCTGTGATTAAGGAACCAACTT	233-241
SSRY 161*	AAGGAACACCTCTCCTAGAATCA CCAGCTGTATGTTGAGTGAGC	183-212
SSRY 183*	TGCTGTGATTAAGGAACCAACTT TTAACTTTTTCCAGTTCTACCCA	205-220
SSRY 235*	CAGCTTTGCCATCCAATTTT CAGCAAAATGACATGAGTGTATCTC	218-250

3.6.2 Desnaturação e corrida eletroforética das amostras

As amostras, assim como o fago *Lambda*, foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos, antes de serem carregadas no gel de poliacrilamida, mas previamente se acrescentou no tampão de carregamento o corante DYE para géis de poliacrilamida (2 μ L do volume por amostra) com a finalidade de conferir maior densidade na amostra. Para a corrida eletroforética utilizou-se 500 mL de tampão TBE 1X respectivamente, realizando-se uma pré-corrida a 1800 V por 30 minutos. O tempo de corrida foi aproximadamente de 4 horas a 1800 V.

3.6.3 Coloração com nitrato de prata

Para visualizar as bandas amplificadas utilizou-se o protocolo de coloração não radioativa, utilizando nitrato de prata a qual tem as seguintes fases, que são uma modificação ao protocolo proposto por Creste et al. (2001):

- Fixação: Uma vez transcorrido o tempo de corrida, foi separado o vidro menor, o qual contém o gel aderido para ser submergido em uma solução de ácido acético a 10% (890 mL de água deionizada, 100 mL de álcool absoluto e 10 mL de ácido acético) em agitação durante 30 minutos aproximadamente. A fixação é um passo que evita a difusão das moléculas de ácido nucléico separadas na matriz do gel, e também ajuda a remover e neutralizar reagentes químicos indesejados (como a uréia e o tampão de corrida).
- Impregnação de prata: O gel com as seqüências microssatélites já fixado, foi colocado em uma solução de nitrato de prata a 0,1% em agitação por 30 minutos. Nesta etapa o íon de prata reage com as bases do DNA.
- Revelação: Neste passo o gel é submergido e agitado em uma solução reveladora (hidróxido de sódio (15g) e formaldeído (2 mL)), até obter a intensidade e contraste desejados das bandas que correspondem aos microssatélites. A presença do formaldeído dá sensibilidade e contraste; além disso, provavelmente, reduz a prata a um nível muito baixo mas o suficiente para produzir sítios de nucleação inicial ao redor do substrato de coloração. Os géis contendo os padrões de bandas de microssatélites foram, em seguida, dispostos sobre uma luminária para serem devidamente interpretados e fotografados.

3.7 Análises da diversidade genética

Para a análise estatística tomou-se os dados genotipados para os 14 iniciadores microssatélites, para estimar a diversidade genética de cada população (considerando como população a roça ou quintal de um agricultor, contendo no mínimo três a quatro variedades de mandioca). Foram obtidos os seguintes índices: número de alelos por loco, frequência alélica, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada (NEI, 1978) ou diversidade gênica e índice de fixação. Foi também estimado o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de cada iniciador. Foi realizada uma análise de estrutura genética das populações, por meio dos parâmetros de diversidade genética de Nei (1973), como a diversidade gênica total (H_T), a diversidade gênica dentro de populações (H_S), a diversidade genética entre populações (D_{ST}) e a proporção da diversidade genética entre populações (G_{ST}). Estes índices nos informam como está distribuída a diversidade, ou seja, se a diversidade se encontra entre e dentro de populações, comunidades e municípios da região de estudo, que é a Baixada Cuiabana. Para estas análises, foram utilizados os programas Bioestatísticos como TFPGA (MILLER, 1997), GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001), FSTAT (GOUDET, 2001) e Genalex (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Para determinar a estrutura genética das etnovariedades foi utilizada a seguinte abordagem: foram agrupados todos os genótipos com o mesmo nome popular dentro de uma comunidade, os quais formam considerados como um grupo ou população, para depois fazer a análise dos parâmetros de diversidade genética de Nei (1973), ou seja, dos parâmetros H_T , H_S e G_{ST} , com os quais foi possível verificar como encontra-se distribuída a variabilidade entre e dentro de etnovariedades, seguindo metodologia utilizada por Kizito et al. (2007).

A análise de variância molecular (AMOVA) é um método que serve para analisar a variação molecular dentro de uma espécie, e é baseada num modelo hierárquico, sendo diferenciada da análise de ANOVA, a qual pode conter diferentes suposições evolutivas, sem modificar a estrutura básica da análise. Os diferentes níveis hierárquicos da diversidade genética, estudados por meio do método AMOVA, podem abarcar: continentes, que podem conter níveis hierárquicos menores, regiões geográficas dentro de um continente, populações dentro de uma região num continente, indivíduos dentro de uma população de uma região, num continente (LOPEZ; FULTON, 2004). No presente estudo, a AMOVA foi utilizada para avaliar o nível de variabilidade em três níveis hierárquicos, ou seja, en-

tre comunidades, entre roças dentro de comunidades e dentro de roças, utilizando para tanto o programa Arlequin v.3.5 (SCHNEIDER et al., 2011). A AMOVA foi também utilizada para a análise da variabilidade intra e intervarietal, ou seja, entre e dentro de etnovariedades.

Para visualizar a distribuição de maneira gráfica desta diferenciação genética, foram estimadas as distâncias genéticas de Nei (1972), utilizando o programa TFPGA (MILLER, 1997) e construídos dendrogramas pelo método Unweighted Neighbor-Joining, utilizando o software DARwin5 (PERRIER et al., 2003). Foi também utilizado o software de Biodiversidade DIVA GIS (HIJMANS, 2004), para obter a distribuição geográfica da diversidade nestes municípios e também para estimar a riqueza alélica nas áreas de estudo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises de diversidade genética

No presente trabalho foram encontrados um total de 49 alelos, observando-se uma média de 3,79 alelos por loco, bem como 100 % de polimorfismo (Tabela 2). Também observa-se que a média da heterozigosidade observada ($\overline{H}_o$) e esperada ($\overline{H}_e$) ou diversidade gênica foi de 0,60 e 0,59, respectivamente. Podemos observar que esses resultados não diferem entre si, representando altos níveis de diversidade genética. Para as 10 co-

Tabela 2 – Número médio de genótipos analisados (N), número médio de alelos por loco ($\overline{A}$), porcentagem de locos polimorficos ($P\%$), Heterozigosidade observada $\overline{H}_o$, heterozigosidade esperada ou diversidade gênica $\overline{H}_e$, para etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta*)

Locus	N	$P\%$	$\overline{A}$	$\overline{H}_o$	$\overline{H}_e$
SSRY8	195	100	3	0,64	0,87
SSRY27	191	100	4	0,55	0,38
SSRY40	190	100	4	0,62	0,52
SSRY141	187	100	4	0,72	0,65
SSRY126	199	100	4	0,70	0,61
SSRY12	207	100	3	0,57	0,73
SSRY183	200	100	3	0,63	0,62
SSRY47	182	100	4	0,62	0,48
SSRY43	173	100	4	0,66	0,56
SSRY28	199	100	3	0,35	0,46
SSRY161	192	100	3	0,65	0,82
SSRY21	196	100	3	0,62	0,53
SSRY35	184	100	3	0,57	0,45
SSRY235	194	100	3	0,52	0,61
Média	192	100	3,79	0,60	0,59

munidades avaliadas neste estudo, o número de alelos por loco variou entre 3 e 4 alelos, com uma média de 3,79 (Tabela 3). Os dados obtidos são muito similares aos relatados por Siqueira et al. (2010) avaliando mandiocas originárias de Mato Grosso do Sul, com

o número de alelos variando entre 2,33 e 4,77, e média de 3,55. Oliveira et al. (2011) também caracterizaram a variabilidade genética de 93 acessos de mandioca originários de Lavras e Campinas com 14 locos, obtendo entre 2 a 4 alelos por loco, com uma média de 2,2.

As frequências alélicas variaram de 0,011 no locus SSRY28 no município de Porto Estrela, a 0,810 para o locus SSRY28 também do município Porto Estrela, como mostrado na Figura 7. Nos municípios em estudo foram encontrados seis alelos privados (Tabela 4). Estes alelos são muito importantes já que podem servir como marcadores específicos de um genótipo determinado e ajudam a acentuar a diferenciação genética entre populações, também é considerado como um fator importante no momento de delimitar áreas prioritárias para conservação *in situ*. Os alelos privados foram encontrados em maior proporção no município de Santo Antonio do Leverger.

A percentagem de polimorfismo variou de 71% a 100%, com média de 95% (ver Tabela 3). Esses resultados mostram que os iniciadores utilizados no presente trabalho possuem um alto poder discriminativo e alto poder informativo para detectar a variabilidade genética. Da mesma forma, Mühlen et al. (2000) obtiveram 97% de polimorfismo no estudo de variabilidade genética de mandioca utilizando marcadores microsatélites.

O presente estudo permitiu detectar altos níveis de diversidade genética para acessos avaliados de mandioca, obtendo-se uma heterozigosidade observada ($\overline{H}_0$) com média de 0,587 (Tabela 3). Valores similares foram obtidos por diferentes pesquisadores que analisaram a diversidade genética em mandioca, como Peroni et al. (2007), avaliando 169 variedades locais de mandioca originárias da Mata Atlântica, em São Paulo, e da Amazônia, utilizando 9 locos SSR, obtendo $\overline{H}_0 = 0,67$. Elias et al. (2004) avaliando variedades locais originárias de cinco localidades da América do Sul, num estudo com oito locos, obtiveram média de $\overline{H}_0 = 0,51$. Mühlen et al. (2000) obtiveram também uma média de $\overline{H}_0 = 0,56$, avaliando 45 etnovariedades provenientes da Amazônia e 9 etnovariedades do litoral sul de São Paulo.

A heterozigosidade pode ser considerada como uma medida da variabilidade genética. Essa medida se refere a quanta variabilidade existe nessa população, e a forma em que essa variabilidade se distribui através dos alelos nos locos em estudo. Um indivíduo para ser heterozigoto depende do número de alelos e da frequência destes na população. Outro fator importante para ter uma população mais heterozigota, é a frequência dos ale-

Tabela 3 – Número médio de genótipos (N), número médio de alelos (Na), porcentagem de polimorfismo (P)%, heterozigosidade observada ($\overline{H}_o$), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica ($\overline{H}_e$) e índice de fixação (f), para cada comunidade de procedência dos genótipos de mandioca (*Manihot esculenta*)

Município	Comunidade	N	Na	$P\%$	$\overline{H}_o$	$\overline{H}_e$	f
CÁCERES	SANTO ANTÔNIO	3,929	3,143	100	0,577	0,591	0,030
CÁCERES	CIDADE NOVA	2,929	2,214	71	0,571	0,391	-0,474
CÁCERES	JUNCO	4,000	2,571	100	60,7	0,533	-0,126
CÁCERES	JARDIM DO TREVO	3,643	2,571	93	0,613	0,468	-0,300
CÁCERES	BOA ESPERANÇA	6,500	2,500	93	0,620	0,475	-0,280
CÁCERES	B.Sto.ANTONIO	8,286	3,214	100	0,535	0,574	0,074
S. ANTÔNIO DE LEVERGER	VARGINHA	38,071	3,357	100	0,438	0,465	0,086
S. ANTÔNIO DE LEVERGER	BARREIRINHO	37,571	3,500	100	0,515	0,574	0,081
PORTO ESTRELA	LUZIA	41,714	3,357	100	0,725	0,583	-0,243
PORTO ESTRELA	BANCO DA TERRA	45,429	3,429	100	0,667	0,599	-0,127
MÉDIA		19,207	2,86	95	0,587	0,525	-0,115

Figura 7 – Frequências alélicas nos municípios em estudo

Tabela 4 – Alelos privados e suas frequências observadas para 211 acessos de mandioca (*Manihot esculenta*) cultivada em três municípios da Baixada Cuiabana

População	Locus	Alelo (pb)	Frequência
CÁCERES	SSRY161	210	0,018
CÁCERES	SSRY161	298	0,018
SANTO ANTÔNIO	SSRY27	265	0,100
SANTO ANTÔNIO	SSRY161	193	0,021
SANTO ANTÔNIO	SSRY161	205	0,007
PORTO ESTRELA	SSRY28	100	0,011

los. A heterozigosidade esperada ou diversidade gênica também foi elevada neste estudo ($\overline{H}_e = 0,525$) (Tabela 3). Os resultados obtidos neste estudo, indicam que os genótipos estudados possuem uma alta diversidade genética.

É importante salientar que os altos valores encontrados para os diferentes índices de diversidade genética neste trabalho poderiam ser devido aos locos SSR utilizados, já que foram reportados como altamente informativo ou polimórficos, mas também essa alta diversidade é devido à base genética no material analisado. A ampla variabilidade genética da mandioca é explicada pelo manejo dos agricultores nos agro-ecossistemas avaliados, cultivando diversas variedades de mandioca em uma mesma roça, e também devido a hábitos de troca de manivas entre si.

É importante mencionar que outro fator que influencia na diversidade é que a mandioca além de ser propagada vegetativamente ainda mantém a reprodução sexual, o que implica em um papel importante na dinâmica evolutiva da mandioca (MARTINS; OLIVEIRA, 2009). As sementes chegam a formar parte do banco de semente formado no solo, chegando a brotar alguns genótipos, gerados dos cruzamentos entre variedades dentro das roças, e dessas plântulas brotadas, algumas são selecionadas para ser incorporadas nos campos dos agricultores tradicionais (DUPUTIÉ et al., 2009). A mandioca tem uma alta diversidade genética também devido à facilidade de polinização e deiscência do fruto dando origem a uma série contínua de genótipos novos. Além disso, alta diversidade genética observada evidencia o fato de que parte do centro de origem e domesticação da mandioca está localizada no Mato Grosso (OLSEN; SCHALL, 1999).

Os resultados obtidos são muito favoráveis se o estudo é destinado ao melhoramento genético, já que existe ampla variabilidade genética, portanto haveria maior possibilidade de encontrar características interessantes que melhorem a produtividade e a resistência a diversos fatores bióticos e abióticos. Tendo encontrado esses níveis de diversidade genética também seria útil na delimitação de áreas de conservação de diversidade.

É importante salientar que além dos três municípios apresentarem altos níveis de heterozigosidade, se observa que a comunidade de Luzia apresentou o maior índice de $\overline{H}_0 = 0,725$, seguida de Banco da Terra com $\overline{H}_0 = 0,667$, sendo que essas duas comunidades pertencem ao município de Porto Estrela (Tabela 3). Luzia é uma comunidade tradicional e Banco da Terra um assentamento formado há 12 anos (OLER, 2012), mas o fato de ser recentemente formado não interferiu na diversidade genética. Isso é uma prova de que também dentro de assentamentos é possível conservar diversidade genética pois os agricultores pela proximidade às comunidades tradicionais participam na rede de troca de material genético.

A agricultura é feita na Comunidade de Luzia de forma tradicional, com uso de técnicas da agricultura itinerante. No Banco da Terra os agricultores desenvolvem suas atividades com técnicas variadas, cultivando mandioca principalmente nos quintais devido à baixa disponibilidade de mão de obra. Os moradores do Banco da Terra possuem forte ligação com o meio urbano das cidades da região, pois parte da família permanece nas sedes do município desenvolvendo outras atividades que complementam a renda familiar (OLER, 2012).

Segundo dados reportados por Oler (2012) a diversidade genética observada nos quintais dos agricultores tradicionais é devido ao processo de troca de manivas; em geral, a procura por manivas externas é motivada pelo desejo de diversificar o acervo, para atender a possíveis necessidades futuras. A busca por aumentar a diversidade é uma prática comum entre os agricultores para melhor adaptação às mudanças que podem ocorrer (ambientais, socioeconômicas, etc.). Tal processo é visto principalmente entre áreas com baixa capacidade de alteração do ambiente (baixa capacidade de aquisição de insumos externos). Observou-se que a interação de troca de manivas é mais constante neste município com uma comunidade cercana de nome Monjolinho, e de igual forma só que com menor intensidade com a comunidade de Salobra Grande e comunidade de Cachoerinha.

Com relação ao nível de fixação (f) (Tabela 3) observa-se que todas as comunidades tem valores próximo de zero o que é comum em plantas alógamas, e também observamos comunidades com valores negativos, o qual evidencia altos níveis de heterozigosidade (Cidade nova, Jardim do trevo, Junco, Luzia e Banco da Terra). Esses resultados são muito similares aos obtidos por Alves-Pereira et al. (2012), que avaliaram variedades de mandioca brava cultivadas por agricultores tradicionais ao longo do Rio Madeira, na Amazônia central.

As roças são consideradas como unidade evolutiva da mandioca, sendo que essa alta diversidade é gerada pelo trabalho conservacionista do agricultor tradicional, onde ele com atividades como troca de material, plantio de diferentes variedades ou por seleção de mandiocas geradas por reprodução sexual, criam essa alta diversidade genética dentro das roças (MARTINS; OLIVEIRA, 2009).

Na análise de estrutura genética obtivemos uma variabilidade genética total (H_T) obtida pelos índices de Nei (1973), uma média de 0,593, o que evidencia a alta diversidade genética na população em estudo. Essa diversidade genética está concentrada dentro das roças (H_S), os valores de H_S variaram entre 0,392 no locos SSRY43 e 0,729 no locos SSRY27 (Tabela 5).

A análise genética entre roças (D_{ST}), apresentou média de 0,039, em quanto a média da proporção da variação observada entre roças (G_{ST}) foi de 0,066.

Outros estudos avaliando variedades locais de mandioca obtiveram resultados parecidos, tais como o trabalho de Mühlen et al. (2000) onde eles obtiveram uma diversidade total de 0,55 e uma diversidade dentro de populações de 0,51. Da mesma forma, observa-se que a maior parte da variabilidade concentra-se dentro de roças ou populações de mandioca, ou mesmo dentro de regiões avaliadas, conforme relatados por Faraldo et al. (2000), Fregene et al. (2003) Lokko et al. (2006), Kizito et al. (2007) e Siqueira et al. (2010). Resultados superiores foram obtidos por Rojas et al. (2011) com uma variabilidade genética total de 0,736 e diversidade dentro das populações de 0,708.

Segundo McKey et al. (2010), a diversidade genética da mandioca não é devido só a ação do homem trocando e selecionando material, produto de reprodução sexual, mas é também produto de efeitos ambientais aos quais está exposta a mandioca. Os autores fazem menção a como o ecossistema em geral tem papéis importantes no sistema de bancos de semente de mandioca no solo, e coloca como exemplo todo o ciclo da germinação das

Tabela 5 – Diversidade dentro de roças (H_S), diversidade genética total (H_T), diversidade entre roças ($D_{ST'}$) e proporção da diversidade genética entre roças ($G_{ST'}$), em 14 locos de microssatélites num total de 211 acessos de mandioca (*Manihot esculenta*) da Baixada Cuiabana

Locus	H_S	H_T	$D_{ST'}$	$G_{ST'}$
SSRY8	0,638	0,642	0,005	0,008
GA12	0,484	0,495	0,012	0,025
SSRY21	0,525	0,551	0,029	0,052
SSRY27	0,729	0,745	0,018	0,024
SSRY28	0,688	0,731	0,048	0,065
SSRY35	0,517	0,656	0,155	0,230
SSRY40	0,496	0,585	0,098	0,165
SSRY43	0,392	0,430	0,042	0,097
SSRY47	0,681	0,669	-0,014	-0,020
SSRY126	0,399	0,407	0,009	0,022
SSRY141	0,565	0,637	0,080	0,125
SSRY161	0,642	0,643	0,001	0,001
SSRY183	0,506	0,537	0,035	0,065
SSRY235	0,551	0,579	0,031	0,053
Média	0,558	0,593	0,039	0,066

sementes; esse ciclo começaria com o fato de que as sementes de mandioca possuem uma substância de elaiosoma que atrai as formigas e outros insetos, esses insetos são atraídos pelo elaiosoma e levam essas sementes até os ninhos e comem a caruncula, deixando assim mais favorável a germinação da semente de mandioca. Em seguida, eles enterram as sementes na superfície do solo, as quais ficam em estado latente, até receber altas temperaturas para quebrar a dormência. Este processo geralmente acontece quando ocorrem queimadas nas roças, ativando a germinação dos novos genótipos; uma vez germinados os agricultores selecionam as melhores plantas, o que levaria a uma escolha de genótipos heterozigotos, os quais seriam depois adicionados mediante reprodução vegetativa.

Também foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA), em diferentes níveis hierárquicos, ou seja, entre comunidades, entre roças dentro de comunidades e

dentro de roças, onde se constatou que a maior parte da variabilidade (92,1%) encontra-se dentro de roças (Tabela 6). Desta maneira, confirmamos os resultados obtidos pelos índices de Nei (1973).

Tabela 6 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando 14 locus SSR entre comunidades, entre roças dentro de comunidades e dentro de roças de mandioca em três municípios da Baixada Cuiabana

Fonte de Variação	Soma de quadrados	Componente de variância	Porcentagem da variância
Entre comunidades	69,810	0,19154	4,43597%
Entre roças	58,815	0,15052	3,48584%
Dentro de roças	1483,232	3,97589	92,07820%
Total	1611,857	4,31795	

Esta análise foi feita para comprovar se existe alguma diferença genética entre os distintos locais onde foram coletados os acessos de mandioca neste estudo, ou seja, comparando a variação entre as 10 comunidades visitadas, bem como entre e dentro de roças. A análise de variância molecular é uma ferramenta quantitativa que serve para confirmar a importante diferenciação genética existente entre e dentro das sub-populações. Essa alta diferenciação dentro das populações é devido a alta heterozigosidade observada a nível das unidades evolutivas que são as roças.

Os resultados mostram uma diferenciação genética entre comunidades de 4,4%, ou seja, baixa diferenciação, da mesma forma que o resultado de diferenciação genética entre roças (3,48%). Este resultado ocorre porque os agricultores tradicionais estão sempre em constante troca de etnovariedades, o que levaria a um alto fluxo gênico entre roças e comunidades, sendo que a máxima diferenciação genética estaria presente dentro de roças, com 92%. Nossos dados coincidem com os obtidos em diversos trabalhos, como em Elias et al. (2000) que obtiveram variação entre populações de 9,8% com a variabilidade genética também concentrada dentro das populações com 80%, e Alves-Pereira et al. (2012) com 86,8% dentro de grupos de variedades (mansas e bravas).

A análise de agrupamento gerou uma árvore genética (Figura 8) onde pode-se verificar a formação de dois grupos, um formado pelo município de Santo Antônio do Leverger,

Figura 8 – Árvore genética para 211 acessos de mandioca (*Manihot esculenta*) dos municípios de Cáceres (C), Santo António do Leverger (S) e Porto Estrela (P)

o segundo grupo uma junção entre os municípios de Cáceres e Porto Estrela. Os genótipos se agruparam baseados na distancia genética de Nei (1973).

A formação bem definida desses grupos evidencia que existe uma maior distancia genética do município de Santo Antônio do Leverger com relação aos genótipos dos municípios de Cáceres e Porto Estrela, uma vez que os genótipos das comunidades do município de Santo Antônio do Leverger têm alelos fixados que não estão presentes nas comunidades dos outros municípios. Esse agrupamento genético também pode se relacionar com o fato de que geograficamente o município de Cáceres fica mais próximo a Porto Estrela e estes municípios estão à maior distância do município de Santo Antônio do Leverger, o que favorece a troca de material entre Cáceres e Porto Estrela.

Segundo os dados relatados por Marchetti (2012) se observa que no município de Santo Antônio do Leverger os agricultores entrevistados dividem as variedades locais em dois grupos: mansas e bravas, as mandiocas mansas (cerca de 90% das etnovariedades encontradas) correspondem àquelas boas para o consumo de mesa, e as mandiocas bravas (10% das etnovariedades) podem ser tóxicas e necessitam de um processamento especial para viabilizar seu consumo, como por exemplo, o processamento das raízes em farinha. O contrario ocorre nos outros dois municípios onde os agricultores só cultivam mandiocas mansas (OLER, 2012), talvez esse fato tenha influencia na separação genética desses dois grupos na árvore genética.

Na análise de agrupamento a nível de comunidades, pode-se observar uma diferenciação genética entre as comunidades, e que as comunidades se agrupam de acordo com o município de origem (Figura 9). Também se evidencia claramente que essas comunidades de Santo Antonio do Leverger (Barreirinho e Varginha), formam um grupo bem separado, informação obtida também na análise de agrupamento por municípios (Figura 8).

Como se mencionou anteriormente, a causa desta separação das comunidades de Santo Antonio do Leverger, poderia ser a fixação de alelos, pela proximidade geográfica entre os outros municípios, ou por aspectos sociais. Por exemplo, se pode observar que a comunidade Santo Antonio do município de Cáceres ficou próxima geneticamente das comunidades de Luzia e Banco da Terra de Porto Estrela. Esse resultado é provavelmente devido ao fato de que uma agricultora tradicional da comunidade de Santo Antonio tem relações familiares e políticas com o município de Porto Estrela.

Já no município de Santo Antonio do Leverger podemos observar que além de ficar

Figura 9 – Árvore genética das comunidades em estudo: Cáceres (Santo Antônio, Cidade Nova, Junco, Bairro Jardim do Trevo, Bairro Boa Esperança e Bairro Santo Antônio), Santo Antônio de Leverger (Varginha e Barreirinho) e Porto Estrela (Luzia e Banco da Terra)

bem diferenciadas as comunidades dos outros municípios, também se observa que há diferença genética entre elas, muito provavelmente devido as diferenças edafoclimáticas existentes, pois a comunidade de Varginha tem solo pedregoso e está localizada a poucos metros da beira do rio. Já a comunidade de Barreirinho tem um solo mais argiloso onde se pode observar pequenos encharcamentos de água nas épocas de chuva (MARCHETTI, 2012).

Pode-se observar que os agricultores cultivam etnovariedades adaptadas a esses aspectos edafo-climáticos característicos de cada comunidade. Por exemplo, os agricultores cultivam a etnovariedade *Rama dura* que predomina em Barreirinho em solos argilosos e a etnovariedade *Vermelha de joaonzinho*, que predomina em Varginha, em solos pedregosos. Tais fatores podem estar levando à diferenciação genética observada entre as duas comunidades de Santo Antonio do Leverger. A diferenciação entre ambas as comunidades de Santo Antonio do Leverger também foi obtida por Amorozo (2000).

Dos 211 genótipos estudados nas diferentes roças nos três municípios (Cáceres, Porto Estrela e Santo Antonio do Leverger), foram registradas 83 etnovariedades (Tabela 7). Estas etnovariedades são provenientes de diferentes locais de origem, produto das migrações, já que os agricultores tradicionais tem a tradição de trocar material, e também de manter na mesma roça diversas etnovariedades. Eles misturam as etnovariedades de mandiocas, sejam bravas ou mansas, isso por segurança alimentar, em função das ameaças de pragas e doenças, assegurando, desta forma, a produção, pois sempre existiram algumas variedades mais resistentes aos fatores bióticos e abióticos a que são expostos. Segundo as coletas feitas nos municípios, podemos observar que o município de Cáceres apresentou menos etnovariedades que os outros municípios, com um total de 23 etnovariedades. Já Porto Estrela apresentou 37 etnovariedades e o município com maior número de etnovariedades foi Santo Antonio do Leverger com 40 etnovariedades (Tabela 7). No município de Cáceres se chegou a observar que este possui 14 etnovariedades exclusivas, que não se encontram nos outros municípios.

Tabela 7: Etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta*) coletadas por municípios

(continua)

ETNOVARIEDADE	CÁCERES	SANTO ANTÔNIO DO LEVERGER	PORTO ESTRELA
Aipim	-	X	-
Aipim branco	-	X	-
Aipim de um ano	X	-	-
Amarela	X	X	X
Amarela de fritar	-	-	X
Amarelinha	-	-	X
Amarguenta	-	X	-
Bacairi	-	-	X
Baixinha seis meses	-	X	-
Branca	-	X	X
Branca embaubada	X	-	-
Branca galhadeira	-	X	-
Brancona	-	-	X
Brancona sem nome	X	-	-
Branquinha	X	X	X
Branquinha da grande	-	-	X
Branquinha de talo roxo	X	-	-
Broto roxo	-	X	-
Broto vermelho	-	X	-
Bugrinha	-	X	-
Cacau	X	X	X
Cacau talo roxo	-	-	X
Cacau broto roxo	-	-	X
Cacau folha fina	-	-	X
Cacau pequizeira	X	-	-
Cacau rama branca	X	-	-
Cacau rama verde	X	-	-

(continua)

ETNOVARIEDADE	CÁCERES	SANTO ANTÔNIO DO LEVERGER	PORTO ESTRELA
Cacau rastreira	-	-	X
Cacau seringueira	X	-	-
Cacau urubu	X	-	-
Cacau vermelinha	X	-	-
Cacau 2	-	X	-
Cacauzinha	-	-	X
Cacauzona	-	-	X
Carne amarela	-	X	-
Chinezinha	-	-	X
De semente	-	X	X
Embirici	-	-	X
Embiricu	-	-	X
Entremeada	-	-	X
Estrondadeira	-	X	-
Gaiadeira	X	X	X
Gaiadinha	-	X	-
Galhadeira vermelha	-	X	-
Jacinta	-	-	X
Japonesa	-	-	X
João cerrado	-	-	X
Juruti	-	X	-
Liberata	X	X	X
Mandioca amarela	X	-	-
Mandioca asa branca	X	-	-
Mandioca do ano	X	-	-
Mandioca broto roxo	X	-	-
Mandioca pão	-	X	-
Mandioca sopa	-	-	X
Mandioca três meses	X	-	-
Mandioquinha	-	-	X

(conclusão)			
ETNOVARIEDADE	CÁCERES	SANTO ANTÔNIO DO LEVERGER	PORTO ESTRELA
Mata rato	-	X	-
Mata rato folha crespa	-	X	-
Moreninha	-	-	X
Mutuana	-	X	-
Olhuda	-	X	-
Pão	-	-	X
Peraputanga	-	X	-
Pinho roxo	-	-	X
Ponta do ferro	-	X	-
Pretinha	-	X	-
Rajadinha	-	-	X
Rama boi	X	-	
Rama dura	-	X	-
Rama vermelha	-	X	-
Rasga eborna	-	-	X
Rosa	-	-	X
Roxinha	-	-	X
Seringueira	-	X	X
Três meses	X	-	X
Três meses branca	X	-	-
Trigo	-	-	X
Urubu	-	-	X
Vassourinha	-	X	X
Vermelha	-	X	X
Vermelinha	X	-	

O município de Porto Estrela possui 31 etnovariedades exclusivas, enquanto que

o município de Santo Antonio do Leverger se apresenta 33 etnovariedades exclusivas, chegando estes dois últimos municípios a ter mais etnovariedades exclusivas que Cáceres.

Verifica-se a frequência com que estas variedades se apresentam em toda a área de estudo em geral, observamos que a variedade com maior frequência foi a *Cacau* (16%), seguida das *Liberata* e *Amarelas* (8%) (Figura 10). Citadas na categoria de outras etnovariedades (23,6%), foram incluídas aquelas etnovariedades que se apresentaram com um só genótipo representativo na população em geral.

Figura 10 – Porcentagem de etnovariedades observadas na área de estudo, nos municípios de Cáceres, Porto Estrela e Santo Antônio do Leverger

Na análise da frequência de etnovariedades por município, observa-se que no município de Cáceres temos maior quantidade da etnovariedade *Cacau* (36%), e da etnovariedade *Três meses* (19%). Já no município de Porto Estrela observamos que a etnovariedade com maior frequência foi a *Cacau* (17%), seguida de *Amarela* com uma frequência de 14%. Finalmente o município de Santo Antonio do Leverger apresentou maior frequência de plantio para a etnovariedade *Olhuda* (11%), seguida da *Mata rato*. Pelo mencionado anteriormente se observa que nos três municípios se tem preferência por cultivar a etnovariedade *Cacau* pelas características boas de adaptabilidade, rendimento e qualidades culinárias, o que foi constatado no estudo feito por Amorozo (2000), Marchetti (2012) e Oler (2012).

Na análise de diferenciação entre e dentro de etnovariedades, fizemos a análise de agrupamento levando em consideração os municípios, ou seja, dentro de cada município em estudo, e observamos o seguinte. Nos municípios de Cáceres, Santo Antônio do Leverger e Porto Estrela se observa que não existe agrupamento por variedades, notando-se

Figura 11 – Porcentagem de etnovariedades por município

uma grande diferenciação entre e dentro de etnovariedades (Figuras 12, 13 e 14). Esse resultado seria produto de uma denominação diversa pelos agricultores, considerando um conjunto de genótipos como uma determinada etnovariedade quando os dados genéticos mostram que não é bem assim. Por exemplo, algumas variedades provavelmente possuem o mesmo nome, em roças e comunidades diferentes, por serem realmente semelhantes morfológicamente, como por exemplo as etnovariedades *Branquinha*, *Mata rato* e *Rama dura*. No entanto, outras etnovariedades, embora tenham recebido o mesmo nome, são bem diferentes morfológicamente na área de estudo, como por exemplo as etnovariedades *Cacau*, *Liberata*, *Amarela* e *Vassourinha*. Segundo Kizito et al. (2007) a denominação diversa poderia ser a causa do intercâmbio de material genético entre comunidades e municípios, o qual levaria a confusões aos agricultores, pois na troca do material o agricultor muda de nome no momento de introduzir o novo material.

Nas árvores genéticas apresentadas nas Figuras 12, 13 e 14, observa-se que os nomes das etnovariedades de cada município vem acompanhados do código da comunidade de onde esta etnovariedade é proveniente. Essa codificação nos ajudou a observar que as etnovariedades não tinham agrupamento nem pela afinidade da comunidade de origem, pois etnovariedades de uma mesma comunidade ficaram bem distantes.

A AMOVA foi outra ferramenta quantitativa para confirmar a importante dife-

Figura 12 – Árvore genética das etnovarietades no município de Cáceres

Figura 13 – Árvore genética das etnovariedades no município de Santo Antônio do Leverger

renciação genética existente entre e dentro das etnovariedades, onde se mostrou que há 97% de diferenciação genética dentro das etnovariedades (Tabela 10), e apenas 3% de diferenciação genética entre variedades. Esses resultados são parecidos aos obtidos por Elias et al. (2000), que fizeram uma análise da variação genética das variedades locais, e obtiveram 80% de variação genética dentro das variedades em estudo. Esse resultado é fruto do intercâmbio de variedades e denominações diferentes, pois cada agricultor tem parâmetros subjetivos no momento de caracterizar morfologicamente uma etnovariedade. Kizito et al. (2007), em Uganda, África, também observaram variação tanto dentro como entre variedades, mas a maior parte da variação foi observada entre variedades, o que difere do nosso estudo. Os autores comentam que, em geral, os agricultores de Uganda mostram capacidade de manter e diferenciar suas variedades.

Tabela 10 – Análises de Variância Molecular (AMOVA) para as etnovariedades em estudo, em três municípios de Santo Antônio do Leverger

Fonte de Variação	Soma de quadrados	Componente de variância	Porcentagem total da variância
Entre etnovariedades	235,059	0,314	3%
Dentro de etnovariedades	1541,264	10,414	97%
Total	1776,323	10,728	100%

A riqueza alélica é uma medida direta da diversidade genética que se utiliza comumente em estudos baseados em marcadores moleculares, que tem por objetivo a seleção das populações para a conservação. A Figura 15 apresenta a distribuição do número de alelos dos locos utilizados na área de estudo. Isso mostra claramente que um maior número de alelos está presente na maior parte dos três municípios, o que condiz com a constatação de que o Estado de Mato Grosso é parte da área considerada como centro de origem e de domesticação da mandioca (OLSEN; SCHAAL, 2001; LÉOTARD et al., 2009).

Para se definir uma área de prioridade para a conservação, deve-se considerar as populações que conservam os alelos mais comuns a nível local, que são os alelos produzidos em alta frequência numa área limitada, e pode indicar a presença de genótipos adaptados a ambientes específicos (ZONNEVELD et al., 2012).

Figura 15 – Riqueza de genótipos diferentes em nível geográfico na área de estudo

Alem disso outra característica importante para delimitar uma área de reserva é que englobe o maior número de alelos diferentes. Isso faz com que essa área seja considerada como uma área de prioridade para conservação *in situ* das mandiocas cultivados nas roças dos agricultores tradicionais. A Figura 16 mostra a riqueza dos locais com alelos mais comuns por locos na área de estudo. O município de Santo Antonio do Leverger estaria evidenciado pela presença de índices altos de diversidade genética, mas também porque concentrou frequências constantes dos alelos mais comuns nessas populações e teve presença de alelos privados. Por esses motivos este município deveria ser considerado como uma área prioritária para conservação *in situ*.

Figura 16 – Área prioritária para conservação *in situ* considerando os municípios de Cáceres, Porto Estrela e Santo António do Leverger

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir dos objetivos deste trabalho geraram as seguintes conclusões:

- Determinamos que existe alta diversidade de mandioca na Baixada Cuiabana, área de estudo considerada como centro de origem, sendo que a maior parte desta diversidade encontra-se distribuída principalmente dentro de roças; isso se deve, provavelmente, à pequena distância geográfica entre comunidades e pela constante troca de material de propagação favorecendo o fluxo gênico entre eles.
- Na análise varietal chegou-se à conclusão de que os agricultores de Cáceres, Santo Antonio do Leverger e Porto Estrela estariam atribuindo o mesmo nome a etnovariedades diferentes, pois observamos que o agrupamento entre as variedades citadas com o mesmo nome não existe e a maior variação estaria dentro das variedades. Essa diversidade de nomes estaria ocorrendo devido as trocas entre agricultores levando a confusões e trocas nos nomes, além da inclusão de plantas produzidas mediante reprodução sexual.
- É importante salientar também que nas análises foram consideradas etnovariedades coletadas em comunidades tradicionais e em assentamentos, os quais tem pouco tempo de formação, com uma média de 12 anos. No entanto, dentro desses assentamentos também se observa alta diversidade genética, como no caso do Assentamento de Banco da Terra do município de Porto Estrela, o que indicaria que esses assentamentos também podem servir para conservação da diversidade genética.
- Na análise de correlação geográfica e riqueza alélica, observamos que a maior parte da área em estudo possui elevada riqueza alélica, pela presença dos alelos em toda a área de maneira quase uniforme. Com relação à determinação de áreas prioritárias para conservação *in situ*, podemos observar que o município de Santo Antonio do Leverger é a mais indicada, pela presença da maioria dos alelos encontrados, pela riqueza de diversidade e também pela presença de alelos privados. Esta área de estudo poderia se tornar um local de conservação de diversidade, pois a partir dessa base genética pode-se auxiliar os programas de melhoramento genético em mandioca.

REFERÊNCIAS

- ALLEM, A. C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Gatersleben, v.41, n.3, p.133–150, 1994.
- ALLEM, A. C. The origins and taxonomy of cassava (*Manihot esculenta* Crantz. subespecie *esculenta*). In: Cassava: Biology, production and utilization (HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Ed.)), **CAB International**, Wallingford UK, 2000. 1-16.
- ALVES-PEREIRA, A.; PERONI, N.; ABREU, A. G.; GRIBEL, R.; CLEMENTE, C. R. Genetic structure of traditional varieties of bitter manioc in three soils in Central Amazonia. **Genetica**, New York, v.1, p.1–13, 2012.
- AMOROZO, M. C. M. Um Sistema de Agricultura Camponesa em Santo Antonio do Leverger, Mato Grosso, Brasil. **Tese de Doutorado**, FFLCH, USP, São Paulo, 269p.
- AMOROZO, M. C. M. Management and conservation of *Manihot esculenta* Crantz. germplasm by traditional farmers in Santo Antônio do Leverger, Mato Grosso State, Brazil. **Etnoecológica**, Tabasco, v.4, n.6, p.69–83, 2000.
- ASANTE, I. K.; OFFEI, S. K. RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. **Euphytica**, Wageningen, v.131, p.113–119, 2003.
- BALLOUX, F.; LUGON, M. N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.11, n.2, p.155–165, 2002.
- BEECHING, J. R.; MARMEY, P.; GAVALDA, M. C.; NOIROT, M.; HAYSON, H. R.; HUGHES, M. A.; CHARRIER, A. An assessment of genetic diversity within a collection cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm using molecular markers. **Annals of Botany**, Devon UK, 72, p.515–520, 1993.
- BHATTACHARJEE, R.; FERGUSON, M.; GEDIL, M.; DUMET, D.; INGELBRECHT, I. Field collection, preservation and large scale DNA extraction procedures for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.8, n.15, p.3424–3430, 2009.

BOSTER, J. S. Inferring decision making from preferences and behaviour: an analysis of Aguaruna Jívaro manioc selection. **Human Ecology**, Delhi, v.12, n.4, p.343–358, 1984.

BRUSH, S. B. The issues of in situ conservation of crop genetic resources, genes in the field: On farm conservation of crop diversity. In: IPGRI (Ed.). **Genes in the Field**. Rome Italy, 2000. p.288.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, Wageningen, v.120, n.1, p.133–142, 2001.

CARVALHO, L. J. C. B.; SOUZA, C. R. B.; CASCARDO, J. C. M.; CAMPOS, L. Identification and characterization of novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v.56, n.4, p.643–659, 2004.

CEREDA, M. P. Agricultura: Tuberosas amiláceas latino americanas. **Fundação Cargill**, São Paulo, v.2, p.537, 2002.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; HALSEY, M. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Reproductive biology and practices for confinement of experimental field trials. **Report Prepared for the Program for Biosafety Systems.**, Washington, D.C.: Program for Biosafety Systems, p.1–25, 2005.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. P.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; KRESOBICH, S.; FREGENE, M. A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, n.3, p.493–501, 1998.

CLEMENT, C. R.; CRISTO-ARAUJO, M. D.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; PEREIRA, A. A.; PICANÇO-RODRIGUEZ, D. Origin and domestication of native amazonian crops. **Diversity**, Switzerland, v.2, n.1, p.72–106, 2010.

COLOMBO, M. R.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. flabellifolia* and *M. peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.2, p.417–423, 2000.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v.120, n.1, p.158–164, 2003.

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.

DUPUTIÉ, A. M.; DAVID, F.; HAXAIRE, P. C.; MCKEY, D. Traditional amerindian cultivators combine directional and ideotypic selection for sustainable management of cassava genetic diversity. **Evolutionary Biology**, Auckland, v.22, n.1, p.1317–1325, 2009.

ELIAS, M.; MÜLHEN, G. S.; MCKEY, D.; TOHME, A. C. R. J. Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot Esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**, New York, v.58, n.2, p.242–256, 2004.

ELIAS, M.; PANAUD, O.; ROBERT, T. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. **Heredity**, New York, v.85, p.219–230, 2000.

EMPERAIRE, L.; PINTON, F.; SECOND, G. Une gestion dynamique de la diversité variétale du manioc en Amazonie du Nord-Ouest. **Nature**, New York, v.6, n.2, p.27–42, 1998.

FAOSTAT. **Rango de los países en el mundo, por producto**, 2009, <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339>. Acesso em: 20 novembro 2011.

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

FERREIRA, C. F.; ALVES, E.; PESTANA, K. N.; JUNGHANS, D. T.; KOBAYASHI, A. K.; SANTOS, V. D. J.; SILVA, R. P.; SILVA, P. H.; SOARES, E.; FUKUDA, W. Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microssatélites. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.8, p.23–29, 2007.

- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA**, Brasília, n.1, p.220, 1998.
- FREGENE, M. A.; SUAREZ, M.; MKUMBIRA, J.; KULEMBECA, H.; NDEDYA, E.; KULAYA, A.; MITCHEL, S.; GULLBERG, U.; ROSLING, H. Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in an asexually propagated crop. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.107, n.6, p.1083–1093, 2003.
- FRETES, F. **Mandioca una opción industrial**. Asunción: Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional, 2010. 54p.
- FUKUDA, W. M. G.; COSTA, I. R. S.; VILARINHOS, A. D.; OLIVEIRA, R. P. **Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização**. Brasília: EMBRAPA, 1996. 103p.
- FULLER, D. Q. Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: Recent archaeobotanical insights from the old world. **Annals of Botany**, Devon UK, v.100, n.5, p.903–924, 2007.
- GOUDET, J. **A computer program to calculate F statistics**, 2001, <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso em: 25 outubro 2011.
- GROVER, A.; SHARMA, P. C. Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution? **Current Science**, Bangalore, v.100, n.2, p.859–869, 2011.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. **Conservation genetics of endemic plant species**. In: (J. C. AVISE; HAMRICK, J. L. (Ed.)) . New York: CHAPMAN and HALL, 1996. p.281–304.
- HARLAN, J. R.; DEWET, J. M. J. A rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Rennweg, v.20, n.4, p.509–517, 1971.
- HERSHEY, C.; IGLESIAS, C.; IWANAGA, M.; TOHME, J. Definition of a core collection for cassava. In: International Network for Cassava Genetic Resources. In: COLOMBIA, 10, International Plant Genetic Resources, 1994. **Report of the First Meeting, CIAT**; resumos. Rome: IPGRI, 1994. 145–156.

- HIJMANS, R. J. The effect of climate change on global potato production. **American Journal of Potato Research**, Lima, 80, p.271–280, 2003.
- HIJMANS, R. J.; GUARINO, L.; BUSSINK, C.; MATHUR, P.; CRUZ, M.; BARRANTES, I.; ROJAS, E. **Sistema de infomacion geográfica para el análisis de datos de distribución en especies**. Roma: IPGRI-CIP, 2004. 83p.
- HUELSENBECK, P. J.; ANDOLFATTO, P.; HUELSENBECK, T. Structurama: bayesian inference of population structure. **Evolutionary Bioinformatics**, California, v.7, n.1, p.55–59, 2011.
- HURTADO, P.; OLSEN, K.; BUITRAGO, C.; OSPINA, C.; MARIN, J.; DUQUE, M.; VICENTE, C. D.; WONGTIEM, P.; WENZEL, P.; KILLIAN, A.; ADELEKE, M.; FREGENE, M. Comparison of simple sequence repeat (SSR) and diversity array technology (DArT) markers for assessing genetic diversity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Genetic Resources**, Rome, 6, n.3, p.208–214, 2008.
- IBGE. **Indicadores Agropecuários 1996-2003**, 2003, <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/indicadoresagro-19962003/default.shtm>. Acesso em: 20 novembro 2011.
- KALIA, R. K.; RAI, M. K.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Wageningen, v.177, n.3, p.309–334, 2010.
- KERR, W. E.; CLEMENT, C. R. Práticas agrícolas de conseqüências genéticas que possibilitaram aos índios da Amazônia uma melhor adaptação às condições ecológicas da região. **Acta Amazônica**, Manaus, v.10, n.2, p.251–261, 1980.
- KIZITO, E. B.; CHIWONA-KARLTUM, L.; EGWANG, T.; FREGENE, M.; WESTERBERGH, A. Genetic diversity and variety composition of cassava on small-scale farms in Uganda: an interdisciplinary study using genetic markers and farmer interviews. **Genetica**, New York, v.130, n.3, p.383–393, 2007.
- KÖHLER, F. E. Medizinal pflanzen in naturgetreuen abbildungen mit kurz erläuterndem. **Gera-Untermhaus**, p.620, 1887.

LÉOTARD, G.; DUPUTIÉ, A.; KJELLBERG, F.; DOUZERY, E. J. P.; DEBAIN, C.; GRANVILLE, J. J.; MCKEY, D. Phylogeography and the origin of cassava: new insights from the northern rim of the Amazonian basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Michigan, v.53, n.1, p.329–334, 2009.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data**, 2001, <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>; Massachusetts. Acesso em: 22 Outubro 2011.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, Massachusetts, v.44, n.3, p.397–401, 1989.

LOKKO, Y.; DIXON, A.; OFFEI, S.; DANQUAH, E.; FREGENE, M. Assessment of genetic diversity among African cassava *Manihot esculenta* Crantz accessions resistant to the cassava mosaic virus disease using SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Gatersleben, v.53, n.7, p.1441–1453, 2006.

LOPEZ, F. V.; FULTON, T. Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module. **IPGRI**, p.85, 2004.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, New Jersey, v.15, n.1, p.65–95, 1984.

MARCHETTI, F. F. **Agricultura tradicional e a manutenção da agrobiodiversidade em comunidades rurais do município de Santo Antonio do Leverger - MT**. Rio Claro-SP, 2012. 101p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

MARTINS, P. S.; OLIVEIRA, G. C. X. Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos. In: VIEIRA, I. C. G.; DA SILVA, J. M. C.; OREN, D. C.; D'INCAO, M. A.(Ed.). **Diversidade biológica e cultural da Amazônia**, 2a. ed. Parte III. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p.379–391, 2009.

MARTÍNEZ, M. G.; JIMÉNEZ, J. R.; CRUZ, R. D.; JUÁREZ, E. A.; GARCÍA, R.; CERVANTES, A.; MEJÍA, R. H. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México.

Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, v.73, n.2, p.155–281, 2002.

MBA, R. E. C.; STEPHENSON, P.; EDWARDS, K.; MELZERS, S.; NKUMBIRA, J.; GULLBERD, U.; APEL, K.; GALE, M.; TOHME, J.; FREGENE, M. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, n.1, p.21–31, 2001.

MCKEY, D.; BECKERMAN, S. Chemical ecology, plant evolution and traditional cassava cultivation systems. In: Tropical Forest, People and Food (Hladik C. M.; Hladik A.; Pagezy H.; Linares O. F.; Koppert G. J. A.; Froment A.; (ED.)). **UNESCO**, Paris, p.83–112, 1993.

MCKEY, D.; ELIAS, M.; PUYOL, B.; DUPUTIE, A. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. **New Phytologist**, Lancaster, v.186, p.318–332, 2010.

MILLER, E. T. Archaeology in the hydroelectric projects of eletronorte:. **Preliminary results smithsonian Institution**, Washington, v.2, 1992.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA): a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.** V. 1,3, 1997, <http://www.bioweb.usu.edu/mpmbio>, Arizona. Acesso em: 22 outubro 2011.

MKUMBIRA, J.; CHIWONA-KARLTUN, L.; LANGERCRANTZ, U.; MAHUNGU, N.; SAKA, J.; MHONE, A.; BOKANGA, M.; BRIMER, L.; GULLBERG, U.; ROSLING, H. Classification of cassava into 'bitter' and 'cool' in Malawi: from farmers' perception to characterization by molecular markers. **Euphytica**, Wageningen, v.132, n.1, p.7–22, 2003.

MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, Madison, v.43, n.4, p.1235–1248, 2001.

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v.8, n.3, p.181–194, 2009.

MOYIB, O. K.; ODUNOLA, O. A.; DIXON, A. G. O. SSR markers reveal genetic variation between improved cassava cultivars and landraces within a collection of Nigerian cassava germplasm. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.6, n.23, p.2666–2674, 2007.

MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e microssatélites**. São Paulo, 1999. 176p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

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

NASSAR, N. M. Wild *Manihot* species native to Central Brazil for cassava breeding. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.58, n.1, p.257–261, 1978.

NASSAR, N. M. Cassava, *Manihot esculenta* and wild relatives: their relationships and evolution. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Gatersleben, v.48, n.5, p.429–436, 2001.

NEI, M. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**, Berlin, v.3, n.4, p.460–465, 1972.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.70, n.12, p.3321–3323, 1973.

NEI, M. Estimatio of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Pittsburgh, v.89, n.3, p.583–590, 1978.

OLER, J. R. L. **Conservação da agrobiodiversidade por agricultores de pequena escala em Mato Grosso-Brasil**. Rio Claro-SP, 2012. 94p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

- OLIVEIRA, M. N. R.; CARVALHO, S. P. D.; BOSCO, J. D. S.; ANTONIO, R. P. Genetic variability among cassava accessions based on SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosas, v.11, p.263–269, 2011.
- OLIVEIRA, M. V. C.; PEREIRA, D. B.; APARECIDA, G. S.; PEREIRA, S. C.; BAMBINE, L. H. A. Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microssatélites. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v.43, n.1, p.170–176, 2012.
- OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v.53, n.4, p.517–526, 2004.
- OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. **American Journal of Botany**, Missouri, v.88, n.1, p.131–142, 2001.
- OLSEN, K. M.; SCHALL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.96, n.10, p.5586–5591, 1999.
- OSPINA, B.; CEBALHOS, H. Taxonomía y morfología de la Yuca. In: CIAT (Ed.). **La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización**. Colombia: Cali, 2002. p.16–32.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6, Vancouver, p.288–295, 2006.
- PERONI, N. **Folck taxonomy and intra specific diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) in the swidden traditional plots in Atlantic Forest areas at the southeast of São Paulo State**. Piracicaba, 1998. 74p. Dissertação (Mestrado) - University of São Paulo.
- PERONI, N.; HANAZAKI, N. Current and lost diversity of cultivated varieties, especially cassava, under swidden cultivation systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, Zürich, v.92, p.171–183, 2002.
- PERONI, N.; KAGEYAMA, Y. P.; BEGOSSI, A. Molecular differentiation, diversity, and folk classification of "sweet" and "bitter" cassava (*Manihot esculenta*) in caíçara and

caboclo management systems (Brazil). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Gatersleben, v.54, n.6, p.1333–1349, 2007.

PERRIER, X.; FLORI, A.; BONNOT. Data analysis methods. New Hampshire. **Enfield, Science Publishers**, p.43–76, 2003.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; ROY, J. K.; BALYAN, H. S.; GUPTA, P. K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, n.3-4, p.584–592, 2000.

PUJOL, B.; DAVID, P.; MCKEY, D. Microevolution in agricultural environments: how a traditional Amerindian farming practice favours heterozygosity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae). **Ecology Letters**, Vancouver, v.8, n.2, p.138–147, 2005.

PUJOL, B.; RENOUX, F.; ELIAS, M.; RIVAL, L.; MCKEY, D. The unappreciated ecology of landrace populations: conservation consequences of soil seed banks in cassava. **Biological Conservation**, Boston, v.136, n.4, p.541–551, 2007.

RAJEEV, K.; VARSHNEY, B.; THUDI, M.; RAMESH, K. A.; ANDREAS, B. Genic molecular markers in plants-development and applications. **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT)**, Patancheru, v.2, p.13–29, 2007.

RAJI, A. J.; FAWOLE, I.; GEDIL, M.; DIXON, A. G. O. Genetic differentiation analysis of African cassava (*Manihot esculenta*) landraces and elite germplasm using amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers. **Annals of Applied Biology**, London, v.155, n.2, p.187–199, 2009.

RIOS, L. L. Descriptores para la caracterización del cultivo de la Yuca. In: INIEA (Ed.). **Manual para caracterización in situ de cultivos nativos, conceptos y procedimientos**. Lima: , 2006. p.106–118.

RIVAL, L.; MCKEY, D. Domestication and diversity in manioc (*Manihot esculenta* Crantz ssp. *esculenta*, Euphorbiaceae). **Chicago Journals**, Chicago, v.49, n.6, p.1119–1128, 2008.

- ROCHA, O.; ZALDIVAR, M. E.; CASTRO, L.; CASTRO, E.; BARRANTES, R. Microsatellite variation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in home gardens of Chibchan Amerindians from Costa Rica. **Conservation Genetics**, Netherlands, v.9, n.1, p.107–118, 2008.
- ROGERS, D. J. Some Botanical and Ethnological considerations of *Manihot esculenta*. **Economic Botany**, New York, v.19, n.4, p.369–377, 1963.
- ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. Cultivo da mandioca para região do Cerrado. In: PRESS, H. (Ed.). *Manihot Manihotoides (Euphorbiaceae)*. New York: , 1973. p.
- ROGERS, D. J.; FLEMING, H. S. A monograph of *Manihot esculenta* with an explanation of the taximetrics methods used. **Economic Botany**, New York, v.27, n.1, p.1–113, 1973.
- ROJAS, M. M.; CORREA, A. M.; SIRITUNGA, D. Molecular differentiation and diversity of cassava (*Manihot esculenta*) taken from 162 locations across Puerto Rico and assessed with microsatellite markers. **AoB Plants**, Oxford, v.2011, n.1, p.1–13, 2011.
- SALICK, J.; CELLINESE, N.; KNAPP, S. Indigenous diversity of cassava: generation, maintenance, use and loss among the Amuesha, Peruvian upper Amazon. **Economic Botany**, New York, v.51, n.1, p.6–19, 1997.
- SAMBATTI, J. B. M.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Folk taxonomy and evolutionary dynamics of cassava: A case study in Ubatuba, Brazil. **Economic Botany**, New York, v.55, n.1, p.93–105, 2001.
- SANTANA, A.; OKAMOTTO, P. T.; BARBOZA, L. C.; GALLUCI, L. **Estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula)**. São Paulo, 2008. 81p. Dissertação (Mestrado) - SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas.
- SCHNEIDER, S.; ROSSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin: a software for population data analysis**, 2000, <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>. Acesso em: 25 outubro 2011.
- SHARMA, A.; NAMDEO, A. G.; MAHADIK, K. R. Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. **Pharmacognosy**, Mumbai, v.2, n.3, p.23–34, 2008.

SIMIÃO, S. A.; SANTOS, L. S. C.; ARAUJO, N. H. T.; VENDRUSCOLO, J. A.; VIEIRA, C. T.; OLIVEIRA, H. L. M.; GRUBER, R. M. **Diagnóstico da cadeia produtiva agroindustrial da mandioca: Mato Grosso. Cuiabá.** Mato Grosso: SEBRAE, UNIVAG, 2003. 144p.

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

SIQUEIRA, V. B. M.; QUEIROZ, S. J. R.; BRESSAN, E. A.; BORGES, A.; PEREIRA, K. J. C.; PINTO, J. C.; VEASEY, A. E. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.32, n.1, p.104–110, 2009.

SOUZA, L. S.; FIALHO, J. F. Cultivo da mandioca para região do Cerrado. In: EMBRAPA (Ed.). **EMBRAPA Mandioca e Fruticultura**. Brasília: 73, 2003. p.106–118.

SPOONER, R.; TREUREN, R. V.; VICENTE, M. C. Molecular markers for genebank management. **IPGRI**, p.126, 2005.

SRAPHET, S.; BOONCHANAWIWAT, A.; THANYASIRIWAT, T.; BOONSENG, O.; TABATA, S.; SASAMOTO, S.; SHIRASAWA, K.; ISOBE, S.; LIGHTFOOT, D. A.; TANGPHATSORNRUANG, S.; TRIWITAYAKORN, K. SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.27, n.1, p.67–75, 2011.

VARSHNEY, K. R.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.23, n.1, p.48–55, 2005.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. D. F.; SILVA, M. S.; FUKUDA, W. M. G.; FILHO, M. O. S. S. Comportamento de genótipos de mandioca de mesa no Distrito Federal. **Revista Ciência Agronômica**, Ceara, v.40, n.1, p.113–122, 2009.

VIEIRA, E. A.; FILHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONCECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B. Caracterização molecular de acessos de mandioca açucarados e não açucarados. **Ciência e Agrotecnologia**, Minas Gerais, v.35, n.3, p.455–461, 2011.

VIERSTRAETE, A. **Principle of the PCR**,

1999, <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. Acesso em: 08 maio 2012.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 445p.

ZACARIAS, A. M.; BOTHA, A. M.; LABUSCHAGNE, M. T.; BENESI, I. R. M. Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm from Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica**, Wageningen, v.138, n.1, p.49–53, 2004.

ZONNEVELD, M. V.; SCHELDEMAN, X.; ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M. A.; DAMME, P. V.; GARCIA, W.; TAPIA, C. S.; ROMERO, J.; SIGUEÑAS, M.; HORMAZA, J. I. Mapping genetic diversity of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): application of spatial analysis for conservation and use of plant genetic resources. **Plos One**, San Francisco, v.7, n.1, p.1–14, 2012.