CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA E DIVERSIDADE DE ETNOVARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

MARIA INEZ FERNANDES FARALDO

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo
Novembro - 1994

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Faraldo, Maria Inez

Caracterização isoenzimática e diversidade de etnovarietades de mandioca
(*Manihot esculenta* Crantz) / Maria Inez Faraldo. - - Piracicaba, 1994.

91 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
1995 .

Bibliografia.

1. Isoenzima 2. Germoplasma 3. Mandioca 4. Variabilidade genética I. Título

CDD 633.4

CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA E DIVERSIDADE DE ETNOVARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

MARIA INEZ FERNANDES FARALDO

Aprovada em: 05.06.95

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Paulo Sodero Martinns

ESALQ/USP

Prof. Dr. Gerhard Bandel

ESALQ/USP

Dra. Tereza Losada Valle

IAC/SP

Prof. PAULO SODERO MARTINS

Orientador

Aos meus amigos de turma
do Curso de Pós-Graduação

OFEREÇO.

À memória de meu pai.

À Maria de Lourdes Fernandes Faraldo,
minha mãe, (mulher feito anjo).

Aos meus irmãos, Ana Lúcia, Luis Sérgio,
Cláudia Regina, José Henrique,
Solange Aparecida e Luis André.

À minha sobrinha Tatiana.

Ao meu cunhado Tato.

À minha cunhada Lúcia.

DEDICO.

“Todo aquele que se esmera em cumprir fielmente os seus deveres, preenche o fim para o qual foi criado e firma em si mesmo os princípios de um caráter elevado”.

SMILES

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à Deus pela fé e perseverança concedidas em todos os momentos.

- Ao Prof. Dr. Paulo Sodero Martins, pela orientação segura, estímulo, dignidade e sobretudo sabedoria.

- Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP pela aceitação, e seus docentes pelos ensinamentos e experiências transmitidas através de seus conhecimentos.

- Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial à Ronaldo José Rabello, pela colaboração prestada na condução dos trabalhos de laboratório.

- Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Curi do Departamento de Estatística Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP), de Botucatu-SP, pela colaboração inestimável na análise estatística dos dados.

- À Silvana Marchizelli Gregório e Aparecida Elizabeth dos Santos da Silva, pela revisão da bibliografia, auxílio nos inúmeros levantamentos bibliográficos realizados, e principalmente pela atenção concedida e amizade.

- À Elza Martins Ferraz do Laboratório de Biologia Reprodutiva e Genética de Espécies Arbóreas do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, pela amizade e auxílio na determinação da metodologia de eletroforese.

- Ao Prof. Edson Seizo Mori, do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu-

UNESP, pela troca de experiências profissionais e de vida; e em especial pelo estímulo em fazer Pós-graduação.

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelo apoio, incentivo, oportunidades concedidas e pela amizade sempre presente.

- Ao Dr. Herculano Medina da Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pelos primeiros treinamentos em eletroforese em gel de amido, fundamentais na minha formação.

- Ao Maurício Sedres dos Reis e Elza Guimarães, pela amizade e auxílio na interpretação dos dados de eletroforese de enzimas.

- À Léia e Carmem Piloto do Departamento de Genética pela amizade, convivência e atenção concedida.

- À todos os colegas do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética, que tive a oportunidade de conviver, agradeço pelo companheirismo e amizade.

- À todos os amigos do Laboratório de Genética Ecológica pela convivência e troca de experiências profissionais.

- Ao Rainério Meireles da Silva, pelo companheirismo, ajuda e incentivo na elaboração final deste trabalho.

- À minha família pela demonstração de amor, pelo carinho, pela confiança e pela amizade que nos une.

- À Rossana Rebello Mendes e Lúcia Zampini Faraldo pela amizade e troca de experiências de vida.

- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida e pela atenção às reivindicações feitas durante o curso.

- À todas as demais pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
RESUMO	x
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O Gênero <i>Manihot</i>	4
2.1.1. Taxonomia	4
2.1.2. História da Classificação	5
2.2. Domesticação	10
2.3. Distribuição	15
2.4. Citogenética.....	17
2.5. Caracterização isoenzimática e molecular	20
2.6. Etnovariedades.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. MATERIAL	30
3.1.1. Germoplasma utilizado.....	30
3.1.2. Localização das áreas de coleta do material	32
3.1.3. Tecidos das plantas para eletroforese de isoenzimas	33
3.2. MÉTODOS	34
3.2.1. Análises eletroforéticas.....	34
3.2.1.1. Extração de isoenzimas.....	35
3.2.1.2. Procedimentos de eletroforese.....	35

3.2.1.3. Leitura dos zimogramas	42
3.2.2. Análise genético-biométrica	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Procedimentos de eletroforese e padrões de isoenzimas	47
4.2. Interpretação genética dos zimogramas	56
4.3. Parâmetro Genético-Biométrico em populações de <i>M. esculenta</i>	61
4.3.1. Análise da variabilidade genética em roças (populações clonais) de <i>Manihot esculenta</i>	61
4.3.2. Análise de agrupamento - Padrões de similaridade	72
5. CONCLUSÕES	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

**CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA E
DIVERSIDADE DE ETNOVARIEDADES DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz)**

**Autor: Maria Inez Fernandes Faraldo
Orientador: Prof. Dr. Paulo Soderio Martins**

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização e quantificação da variabilidade isoenzimática observada no germoplasma de mandioca (*M. esculenta*) na agricultura tradicional do sul do Estado de São Paulo.

As etnovariedades foram avaliadas pela técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de penetrose 30 à 13%, a partir de extratos frescos de folhas recém expandidas. Foram determinados e estudados 12 locos isoenzimáticos, sendo nove polimórficos, pertencentes a cinco sistemas: malato desidrogenase (MDH - E.C. 1.1.1.37), leucina aminopeptidase (LAP - E.C. 3.4.11.1), xiquimato desidrogenase (SKDH - E.C. 1.1.1.25), alfa-esterase (Alfa-EST - E.C. 3.1.1.1) e

aspartato aminotransferase (AAT - E.C. 2.6.1.1). O sistema da peroxidase (PER - E.C. 1.11.1.7) foi descartado por não apresentar polimorfismo de bandas.

O polimorfismo isoenzimático observado nas populações estudadas é função da distribuição geográfica, uma vez que as populações do Litoral sul de São Paulo apresentam maior variabilidade que as populações do Vale do Ribeira.

Nas análises dos dados foram estimados os parâmetros de variabilidade entre e dentro de populações, índice de similaridade genética pelos métodos de “Simple Matching” e “Jaccard”, obtendo fenogramas pelo método de agrupamento U.P.G.M.A. (Unweighted pair-group method average), entre outros.

O sistema de agricultura autóctone praticado pelos agricultores das comunidades negras e caiçaras matem e amplifica o nível de variabilidade intraespecífica, através de processos de hibridação introgressiva, troca de material entre agricultores, fluxo gênico, recombinação, introdução de variedades novas e mutação.

Entre as principais conclusões destacam-se as seguintes:

- Os parâmetros de heterozigosidade média estimados demonstraram altos níveis de variação genética para as roças de mandioca ($H_o=0,242$), sendo superiores à média de dados observados na literatura ($H_o=0,225$).
- Os resultados mostraram maior grau de variabilidade dentro das roças, sendo a roça 1 (roça Pedrinhas-1) a mais polimórfica (75,0% de variabilidade).
- A diversidade intraespecífica está diretamente relacionada com a estrutura sócio-cultural do local.
- As etnovariedades foram agrupadas em quatro grupos fenéticos, sendo que a de número 27 (Gema de ovo) formou um único grupo.

- Dados de isoenzimas servem para auxiliar os melhoristas nas estratégias de melhoramento genético da mandioca nas roças de agricultura autóctone, no sentido de detectar a distribuição da variabilidade genética presente nas populações.

**ISOENZIMATIC CHARACTERIZATION AND
DIVERSITY OF ETHNOVARIETIES OF CASSAVA
(*Manihot esculenta* Crantz)**

**Author: Maria Inez Fernandes Faraldo
Adviser: Prof. Dr. Paulo Soderro Martins**

SUMMARY

The main objective of this work was the characterization and quantification of isoenzyme variation of cassava germplasm (*Manihot esculenta* Crantz) from areas of traditional agriculture in the southern region of the State of S.Paulo.

The ethnovarieties were analysed by starch gel electrophoresis (penetrose 30 à 13%) using fresh yong expanded leaves extracts. Twelve loci were detected and studied, nine of them polymorphic. These loci belong to five

enzymes: malate dehydrogenase (MDH - E.C. 1.1.1.37), leucine aminopeptidase (LAP - E.C. 3.4.1.1.1), shikimate dehydrogenase (SKDH - E.C. 1.1.1.25), alfa-esterase (Alfa-EST - E.C. 3.1.1.1) and aspartate aminotransferase (AAT - E.C. 2.6.1.1). Peroxidase was discarded because it showed no band polymorphism.

The observed isozyme polymorphism is related to the geographical distribution, being the populations from the southern region of the State of S. Paulo more variable than the Ribeira Valley populations.

Variability within and between populations and index of genetic similarity by the Simple Matching and Jaccard methods, were estimated.

The traditional system of agriculture of caiçaras and black communities maintains and amplifies the level of intraspecific variability, through introgressive hybridization, gene flow, recombination, mutation and introduction of new varieties.

The main conclusions are:

- estimate mean heterozygosity indicate high levels of genetic variation for cassava gardens ($H_o=0,242$), with mean higher than those observed in the literature ($H_o=0,225$).
- results show higher degree of variability within gardens, being garden 1 (Pedrinhas-1) the most polymorphic (75,0% of variability).
- the intraspecific variability is related to the local social and cultural community structure.
- the ethnovarieties were grouped in four phenetic groups.
- isozyme data are useful to help traditional farmers and plant breeders in the gardens of traditional agriculture.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura autóctone é definida como um sistema agrícola cujas bases técnicas reportam ao Brasil pré-colonial, e que subsiste até hoje, através das populações indígenas remanescentes ou populações que assimilaram a técnica por meio de seus antepassados.

A mandioca cultivada (*Manihot esculenta*, Crantz) possui papel de destaque dentro deste sistema de agricultura, nas regiões tropicais baixas americanas, sendo a cultura predominante nas roças autóctones do litoral sul do Estado de São Paulo (CURY, 1993).

Como um padrão comum, as roças dessa região são constituídas de diversas variedades locais ou etnovariedades que se constituem em importantes fontes de diversidade genética, principalmente para características específicas não encontradas nos materiais melhorados (Pulcknett et alii, 1987 citados por CLEVELAND et alii, 1994).

A principal espécie cultivada do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae) é a *Manihot esculenta* Crantz, com origem e domesticação não muito bem definidas. É comumente cultivada em regiões equatoriais ou tropicais, especialmente no Brasil, com destaque para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Na África e principalmente nos países asiáticos, seu cultivo é um pouco

mais recente. O seu limite de altitude nos trópicos não ultrapassa 2.000 metros. (HERSHEY & AMAYA, 1989).

A mandioca é considerada uma das plantas tropicais mais importantes, além de se constituir em uma cultura de grande valor sócio-econômico, por ser utilizada como fonte de energia e proteína na alimentação humana, especialmente nos países em desenvolvimento. Mais de 420 milhões de pessoas de 26 países tropicais se alimentam dessa espécie, uma vez que fornece 50% das calorias necessárias à dieta alimentar. Além disso, é também fonte de proteínas principalmente na África, assumindo dessa forma, posição de destaque na conjuntura sócio-econômica das regiões tropicais.

Além de ser incorporada à nutrição humana e animal, é também utilizada como matéria-prima para a produção de amido, utilizado para a fabricação de papel, plástico, goma, etc. As folhas são usadas como vegetais nas dietas das populações da África Central, da Tailândia e do Norte do Brasil. Desse modo, o interesse pela mandioca tem alcançado lugar de destaque e importância cada vez maior em diversos países do mundo, tanto no sentido do consumo "in natura" quanto nos processos de industrialização de seus produtos.

Dados da FAO (1991) revelam que 100 países cultivam a mandioca, dos quais, cinco produzem cerca de 2/3 do total mundial, destacando-se entre eles o Brasil como o responsável por 16% desse total. Cabe destacar, que a produção brasileira nesse mesmo ano foi de 24.600.000 toneladas, atingindo uma produtividade média de 12,6 t/ha.

O IITA (International Institute for Tropical Agriculture) na Nigéria e o CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) na Colômbia vêm desenvolvendo pesquisas de melhoramento genético de mandioca, com a

intenção de produzir novas variedades que apresentem aumento na produção e resistência às doenças próprias da cultura.

No Brasil, o Instituto Agrônomo (IAC), em Campinas, foi pioneiro no trabalho de melhoramento da cultura, desenvolvendo diversos cultivares comerciais (NORMANHA, 1971).

A grande variabilidade genética natural e a diversidade intra-específica da mandioca são as principais riquezas de que dispõem os agricultores e melhoristas, para ampliar a potencialidade de cultivo desta espécie. Esta cultura também reúne características agronômicas importantes como rusticidade, estabilidade e produtividade.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivos:

- a) obtenção de protocolos para eletroforese e interpretação genética dos padrões isoenzimáticos, em etnovariedades de mandioca;
- b) análise da variabilidade genética existente em sete roças (populações clonais) de agricultura autóctone da região sul do Estado de São Paulo, e
- c) estabelecimento das relações taxonômicas entre as etnovariedades e sua origem geográfica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Manihot*

2.1.2. Taxonomia

A mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, subclasse Archichlamydeae, que se diferencia por causa da presença do perianto pouco desenvolvido; à ordem Euphorbiales; família Euphorbiaceae, Tribo *Manihoteae*, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* (HERSHEY & AMAYA, 1984).

Os nomes populares dessa cultura são: yuca, mandioca, cassava, manioc, manioca, tapioca, suahili, mhogo e omowgo.

A ordem Euphorbiales apresenta 7.200 espécies. A característica principal que faz com que esta espécie faça parte do grupo da família Euphorbiaceae é a presença de vasos laticíferos bem desenvolvidos, compostos por células secretoras especializadas denominadas de galactócitos (ROGERS & APPAN, 1973).

Dentro da família Euphorbiaceae, encontram-se espécies com diferentes tipos de porte: arbóreo, arbustivo e herbáceo. Um dos gêneros mais importantes dessa família é representado por *Manihot* (ROGERS & APPAN, 1973).

2.1.2. História da classificação

Pré-Lineana:

Bauhim (1651), citado por ROGERS e APPAN (1973), foi o primeiro botânico europeu a empregar o termo genérico *Manihot*. Ele estudou as plantas coletadas por Andre Theveti no Brasil e, em homenagem ao seu coletor, deu o nome de *M. theveti*, à espécie cultivada denominada mais tarde de *Manihot esculenta*.

Pós-Lineana:

- **1753:-** Lineus colocou a única espécie de mandioca conhecida na época dentro do gênero *Jatropha*, e a chamou de *Jatropha Manihot*. Citou vários trabalhos da época, porém não conseguiu encontrar nenhuma evidência que confirmasse sua classificação.
- **1754:-** Miller, na quarta edição do "Gardener's Dictionary", fez a primeira descrição pós-lineana dentro do gênero *Manihot*, e baseando-se em trabalhos da época, designou a espécie cultivada de *M. theveti*.
- **1763:-** Adanson, foi o primeiro autor a considerar o gênero *Manihot*, pois antes a classificação de Miller é que era válida.
- **1766:-** Crantz, na "Institutiones Rei Herbariae", foi o primeiro a publicar, com validade, o cultigen *Manihot esculenta*.

- **1827:-** Pohl. J.E., em "Plantarum Brasiliae Icones et Descriptions", faz a primeira monografia do gênero *Manihot*. Listou 48 espécies. Lotes originais das coleções das viagens de coleta do autor podem ser encontrados no Herbário de Viena, com uma relação detalhada de todos os locais de origem de onde foram retiradas as diferentes espécies de mandioca.
- **1866:-** Mueller von Argau, no "de Candolle Prodrumus", fez a segunda monografia a respeito do gênero *Manihot*. Este autor listou 43 espécies.
- **1874:-** Mueller von Argau, em "Martius' Flora Brasiliensis XI", Parte II, páginas 438-486, numa terceira monografia, descreveu 72 espécies para o gênero *Manihot*.
- **1907:-** Ule, em uma série de publicações, descreveu muitas novas espécies.
- **1910:-** F. Pax, na Inglaterra, apresentou a quarta monografia do gênero *Manihot*. Esse autor reconheceu um total de 128 espécies, dentro de 11 seções.
- **1911 a 1967:-** Várias outras espécies foram descritas por diferentes pesquisadores, tais como:- *M. chlorosticta* (Standley and Goldman, contr. U.S.Nat.Herb. **13**); *M. auriculata* e *M. michaelis*, descritas por Mc Vaugh, Brittonia **13**; *M. handroana* e *M. jolyana*, por N.D. Cruz.
- **1973 :-** Rogers & Appan apresentaram a quinta e mais recente monografia do gênero *Manihot*, reconhecendo na Flora Neotrópica, 98 espécies divididas em dezenove seções.

Rogers iniciou estudos taxonômicos do gênero *Manihot* em 1952. O objetivo principal foi estudar a evolução da espécie cultivada, porém ficou claro que estudos de evolução de uma espécie melhorada, para uma maior segurança,

devem ser precedidos de análise sistemática detalhada dentro do complexo planta cultivada, selvagens e derivadas. As amostras do cultígeno *M. esculenta* encontradas nos herbários não foram suficientes para descrever a variabilidade e fazer a classificação. Em 1953, estudos de campo foram iniciados no Oeste da Índia e na Costa Rica, envolvendo métodos de amostragem, registros e preparação de herbário documentado com o material observado. (ROGERS & APPAN, 1973).

Um total de 533 populações foram amostradas nos anos seguintes, com fotografias, dados etnológicos e ecológicos registrados para cada uma das populações coletadas. Uma monografia de *M. esculenta* Crantz (ROGERS & FLEMING, 1973), que mostra a classificação intra-específica do cultígeno, é publicada separadamente. (ROGERS & APPAN, 1973).

As espécies classificadas e catalogadas foram todas coletadas por Rogers. O primeiro lote coletado representa as espécies selvagens, que foram guardadas no Jardim Botânico de Nova York (ROGERS & APPAN, 1973).

As espécies do gênero *Manihot* são nativas dos trópicos do Novo Mundo. As espécies encontradas em outras regiões tropicais do mundo foram aí introduzidas após a descoberta da América.

Rogers 1963, citado por ROGERS & APPAN (1973), identifica duas áreas de concentração de espécies que merecem destaque, uma no México e outra no Brasil. As espécies encontradas nessas duas regiões são notadamente distintas, e com exceção da espécie cultivada, nenhuma outra espécie presente na América do Norte é encontrada na América do Sul, e com exceção de *M. brachyloba* que ocorre na América do Sul também foi encontrada na América Central (Costa Rica). O maior número de espécies diferentes pertencem à

América do Sul principalmente no oeste do Brasil, com destaque para os Estados de Goiás, Minas Gerais e interior da Bahia.

- **1985:-** Nassar (1985) descreveu uma nova espécie de *Manihot*, a *Manihot neusana*, nativa do Estado do Paraná, Brasil. Esta espécie parece possuir potencial agrônômico de grande valor, principalmente em relação à aspectos de melhoramento, como tolerância a temperaturas mais baixas.

Por outro lado, no Brasil, NASSAR (1978) definiu quatro centros de diversidade das espécies de *Manihot*. O primeiro centro correspondente ao sul do Estado de Goiás e parte ocidental do Estado de Minas Gerais, com cerca de 38 espécies, representando uma área de maior diversidade. O segundo centro corresponde à parte sul ocidental do México, contendo 19 espécies. O terceiro é representado pelo Nordeste do Brasil; e o quarto pela região ocidental do Mato Grosso e Bolívia.

Parece que a origem do gênero *Manihot* é recente, e que, com poucas exceções, esse gênero ainda se encontra em processo de evolução. As espécies ainda não foram bem delimitadas. A maioria apresenta variação com relação às estruturas vegetativas, porém, seus órgãos florais parecem ser bastante uniformes. É por esta razão, que a hibridização introgressiva parece ter tido um importante papel no desenvolvimento das variações encontradas. (ROGERS & APPAN, 1973).

Muitas espécies silvestres apresentam características semelhantes à mandioca cultivada (*Manihot esculenta*). A mais semelhante parece ser a *Manihot aesculifolia*, uma espécie do México e da América Central. Outras espécies também do México, como a *M. pringlei*, *M. rubricaulis*, *M. angustifolia* e *M. darisii*, mostram grande semelhança com a mandioca cultivada, embora em menor

grau que a espécie anterior. Na América do Sul, também ocorrem algumas espécies que apresentam características morfológicas semelhantes, especialmente *M. epevinosa*, *M. caerulescens*, *M. leptopoda*, *M. janiphoides*, *M. inflata* e *M. pilosa*. (ROGERS, 1973).

ALLEM (1989a), em uma revisão taxonômica realizada dentro do gênero *Manihot*, reduziu a seção Quinquelobae de 14 para 10 espécies. ALLEM (1989b), em um outro trabalho, descreveu quatro novas espécies endêmicas do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae) encontradas no Brasil: *Manihot compositifolia*, nativa da Bahia, espécie endêmica da Mata Atlântica; *Manihot gabrielensis* endêmica a região da “Chapada dos Veadeiros”, Estado de Goiás; *Manihot nogueirae*, espécie endêmica do Distrito Federal; e *Manihot diamantinensis*, encontrada na “Chapada da Diamantina” (BA).

Do ponto de vista da nomenclatura, existem vários epítetos que são empregados para a mandioca cultivada. Muitos pesquisadores se referem a *M. utilissima*; outros como *M. aipi* ou *M. palmata*. Estes epítetos foram (ou são) reflexos das diferenciações principalmente a nível morfológico que ocorrem dentro desse grupo de plantas. Uma outra característica bastante utilizada no processo de identificação é a quantidade de HCN presente nas raízes, como no caso da *M. utilissima* que possui altas concentrações dessa substância; já a *M. dulcis*, *M. aipi*, *M. palmata* contém baixa quantidade de HCN em suas raízes. Por esta razão, diversos pesquisadores têm sugerido que este tipo de identificação no processo de separação de cultivares, que leva em conta as concentrações de HCN presentes nas raízes, não é válida do ponto de vista de taxonomia, e sugerem que permaneça a denominação dada por Crantz- *Manihot esculenta*. (ROGERS, 1965).

Em todas as plantações de mandioca das áreas tropicais e subtropicais do Brasil, os agricultores dividem os cultivares locais existentes em “doces” e “amargos” ou em “mandioca” e “macaxeira” ou “aipim”. Apesar da classificação entre doces e amargas ter bastante importância nas áreas onde se cultiva a mandioca, este tipo de distribuição não se justifica do ponto de vista taxonômico. O ácido cianídrico (HCN) está presente de forma contínua, sendo que as diferentes concentrações não estão correlacionadas com nenhuma característica morfológica ou ecológica (ROGERS & APPAN, 1973).

2.2. Domesticação

A pequena quantidade de informações e de evidências arqueológicas, genéticas, taxonômicas, citogenéticas e evolutivas torna a história da domesticação da mandioca uma questão ainda em aberto e bastante polêmica.

Para muitos autores, como JENNINGS (1979), *Manihot esculenta* não é encontrada na forma selvagem; aparentemente parece ser uma espécie cujo cultivo surgiu por processos de seleção natural, hibridação e pelo próprio cuidado do homem. O gênero ocorre naturalmente no hemisfério ocidental, entre o sudeste dos Estados Unidos (33° N) e Argentina (33° S). Mostra grande diversidade no nordeste do Brasil, estendendo-se até próximo ao Paraguai, e no oeste e sul do México. Dessa forma, a história de sua domesticação ainda continua sendo um assunto em discussão, devido à existência de poucos registros arqueológicos e etnobotânicos disponíveis até o momento.

Ao contrário da maioria das opiniões de que a mandioca é exclusivamente um cultigen, ALLEM (1987) considera que *Manihot esculenta*

ocorre em estado selvagem, e que por interferência do homem (queimadas de áreas, etc.) e pela interferência da própria natureza (seleção natural), através do tempo, acabou se tornando uma espécie cultivada. Novas informações sugerem que a mandioca existe naturalmente em uma considerável área do neotrópico. O autor também acredita que a origem botânica da mandioca se perdeu no passado geológico.

A mais antiga hipótese da origem da mandioca é atribuída ao botânico e geógrafo de plantas, de Candolle, (RENVOIZE, 1973), que se baseou na grande quantidade de espécies selvagens encontradas no Nordeste do Brasil. Muitas evidências mostram a antiguidade do cultivo da mandioca nessa região, levando a manter a hipótese de que esta foi a primeira região a apresentar o cultivo da planta. Porém, HARLAN (1975) tem mostrado que para determinadas espécies, os centros de domesticação podem, às vezes, não coincidir com os centros de diversidade das espécies selvagens. ROGERS (1965, 1973) considera que a mandioca foi cultivada pela primeira vez no Brasil, Venezuela e América Central. Em cada área de cultivo se encontram numerosas espécies silvestres, as quais podem se hibridizar com os cultivares já existentes na área, originando raças colonizadoras. Isto leva a concluir que a domesticação dessa planta, provavelmente, ocorreu simultaneamente em várias áreas.

Segundo HARLAN (1971), a mandioca poderia ser colocada na categoria de cultivos "não cêntricos", ou seja, dentro daquele grupo que parece não ter um centro definido, nem de origem e nem de diversidade, e que parece ter sido domesticado em uma área muito mais ampla.

A maior parte das evidências arqueológicas do cultivo da mandioca são indiretas e se baseiam na presença de cerâmicas e pedaços de pedras, os quais

parecem ser derivados de "raladores", artefatos utilizados no processamento da mandioca, entre muitos grupos primitivos de índios das terras baixas da América do Sul (RENVOIZE, 1973).

A indicação mais antiga a cerca da utilização da mandioca como alimento está baseada em evidências arqueológicas encontradas na parte norte da América do Sul. Estudos feitos no norte da Venezuela e Colômbia por Rouse e Cruxent (1963) e por Reichel-Dolmatoff (1957, 1965), citados por HERSHEY & AMAYA (1989), dão evidências da presença de artefatos para o processamento da mandioca, numa idade correspondente entre 3.000 e 7.000 anos. Porém, estas evidências não servem para provar o cultivo da mandioca nessa época, uma vez que poderiam ser amostras de uma espécie selvagem.

Na Mesoamérica as evidências a respeito do início do cultivo da mandioca são muito fracas. Na serra de Tamaulipas, no México, encontraram-se plantas dissecadas que datam desde 2.500 anos e que incluem sementes identificadas por Mac Neish (1958), citados por HERSHEY & AMAYA (1989), como pertencente à espécie *M. dulcis*. Em escavações feitas em Tehuacan, um pouco mais ao sul do México, encontraram-se tecidos que continham amido de 2.100 a 2.800 anos de idade. Entretanto, estes poderiam ser restos de tecidos de qualquer outra raiz que fosse constituída de amido. Mc Quown citado por BRONSON (1966), indica que a palavra Maia para expressar mandioca estava em uso a cerca de 3.500 anos, o que poderia ser considerado como uma das primeiras indicações da utilização da mandioca na Mesoamérica. A farinha de mandioca foi aparentemente importante no comércio da região Ocidental da América do Sul, durante o segundo e terceiros milênios antes de Cristo.

NASSAR (1978a) estudou 26 espécies selvagens de mandioca que ocorriam no Brasil Central, nas áreas de Goiás Velho e Corumbá de Goiás. Das 26 espécies, 20 foram coletadas em um espaço de aproximadamente 100 Km de diâmetro, nessa região. O estudo se baseou em evidências topográficas, de solo e etnológicas. Das 98 espécies definidas por Rogers e Appan (1973) do gênero *Manihot* 26 foram encontradas nestas duas áreas da região central do Brasil, representando dessa forma, um dos quatro centros de diversidade de mandioca. Nos centros de diversidade, bem como nos chamados "não centros" (HARLAN, 1971), é comum as culturas mostrarem grande diversidade em pequenas áreas. Estas pequenas áreas de diversidade foram definidas por HARLAN (1951) como "microcentros". Esses microcentros parecem ser comuns em espécies de plantas que apresentam grande variabilidade. Foi baseado nessas evidências, que NASSAR (1978) chegou a conclusão de que os padrões geográficos de variação denominado microcentros, talvez pudessem ser aplicados na determinação dos padrões de distribuição da mandioca selvagem no Brasil Central, considerando as áreas do Estado de Goiás (Goiás Velho e Corumbá de Goiás) como microcentros de diversidade.

GRATTAPAGLIA et alii (1987) interessados em relacionar dados de genética bioquímica com dados de taxonomia utilizaram a técnica de eletroforese de proteína solúvel de sementes processada em gel de poliacrilamida com SDS. Para tal, foram analisadas 19 espécies do gênero *Manihot*. Os perfis eletroforéticos obtidos se mostraram heterogêneos quanto ao número, distribuição e intensidade de bandas, estando correlacionados com a ocorrência de variabilidade morfológica, hábito de crescimento e distribuição geográfica do gênero. Das espécies estudadas, *Manihot pilosa* mostrou ser a espécie mais

próxima da espécie cultivada, *Manihot esculenta*. A espécie *M. caerulea* apresentou indicações de introgressão no gênero. Matriz de Similaridade foi o método estatístico empregado na análise dos dados, para quantificar a afinidade entre as espécies estudadas.

GUTIERREZ (1988) durante viagem de estudo no Estuário do Orinoco entre fevereiro/março de 1986 obteve 157 acessos pertencentes à 5 grupos de índios nativos. Parecem existir cerca de 50 variedades amargas para cada uma ou duas variedades doces. O sistema Orinoco/Rio Negro se caracteriza pela ocorrência de uma grande variabilidade representada pela mandioca amarga. O Médio Amazonas e o Solimões têm uma mistura equilibrada entre variedades doces e amargas, enquanto que na Zona Peruana do Amazonas Andino é encontrada uma variabilidade de variedades doces. Antropologistas e especialistas de mandioca advertem que as causas desta situação podem ser explicadas pela migração do homem auxiliada pelo transporte através do rio, favorecendo o fluxo das plantas.

Restos preservados de mandioca (*Manihot*) de seis locais arqueológicos na Costa do Peru foram ilustrados e descritos por UGENT et al. (1986). Para o estudo foram avaliadas diversas coleções em conjunto, num total de 197 pedaços de raízes, 32 fragmentos de cascas, 22 pedaços de pecíolos, 4 cápsulas e 2 brotos de folhas. Baseado em análises de radiocarbono foi possível determinar a idade desses materiais, de 1.800 a.C. a 1532 d.C. Esta é a única coleção de mandioca doce com idade, número e uma riqueza de partes diferentes definidas. Por esta razão, os pesquisadores chegaram à conclusão de que a mandioca parece ser uma espécie de origem múltipla. Um dos principais centros de domesticação da mandioca doce pode ter sido a Costa do Peru, logo após o

período Pós-glacial, quando a área era ainda dominada por vegetação do tipo savana. Outros cultivares e especialmente os amargos podem ter sido domesticados a partir das espécies selvagens, em locais como a região Amazônica, região de caatinga do nordeste do Brasil, nas savanas da Venezuela e Colômbia e Mesoamérica.

2.3. Distribuição

A mandioca cultivada e as espécies selvagens de *Manihot* eram exclusivas das Américas em tempos Pré-Colombianos. Após o descobrimento das Américas, houve uma rápida dispersão dessa cultura. No final do século XVI, os Portugueses levaram estacas de mandioca para a costa Ocidental da África via Golfo de Benin e Rio Congo. Posteriormente, no final do século XVIII, levaram para a Costa Oriental. Desta forma, o cultivo da mandioca se difundiu para as diferentes regiões das Américas. Os conquistadores e comerciantes espanhóis levaram as espécies de mandioca da Costa Ocidental da Mesoamérica para as Filipinas; e daí para o interior do Sudeste Asiático. A introdução ao sul da Índia, a partir da Costa Oriental da África, parece ter ocorrido um pouco mais tarde, provavelmente por volta de 1.800. Sua importância à nível mundial cresceu lentamente, sendo que a partir da metade do século XIX, passou a ser amplamente cultivada como fonte alimentícia, devido a sua grande tolerância a fatores estressantes bióticos e abióticos (ROGERS & APPAN, 1973).

Manihot glaziovii foi transportada para muitas áreas tropicais do Velho Mundo, como uma cultura com potencial para se extrair o látex (borracha). Hoje, esta espécie se encontra em algumas áreas da Malásia, Índia e África.

Várias outras espécies, tais como *M. tristis* subesp. *saxicola*, têm sido constantemente introduzidas na África, Indonésia e Índia, com potencial para se cruzar com a espécie cultivada, *Manihot esculenta*. (ROGERS & APPAN, 1973).

No Novo Mundo, o habitat natural das espécies *M. davisiae* e *M. angustifolia* é na região sul do Arizona, nos Estados Unidos, e na Argentina para as espécies *M. grahami* e *M. anisophylla*. Somente a espécie selvagem *M. brachyloba* é nativa do oeste da Índia, e esta espécie, que apresenta larga distribuição no norte da América do Sul, é encontrada na Ilha de Hispaniola. Não existem explicações para essa distribuição particular, e se atribui sua presença à trocas de introduções. (HERSHEY & AMAYA, 1989).

Como discutido por ROGERS (1973), existem duas concentrações principais de espécies, uma no México e outra no Brasil, sendo que o maior número de espécies encontradas ocorre em antigas áreas do oeste do Brasil Central, especialmente nos Estados de Goiás, Minas Gerais e interior da Bahia.

A maior parte das espécies do gênero *Manihot* foi encontrada em regiões áridas (secas), e apenas algumas espécies são tipicamente de regiões de florestas com estações de chuva. As espécies cujas condições de sobrevivência coincidem com as áreas de florestas úmidas são típicas de florestas abertas pela ação do homem ou pela ação da própria natureza, como inundações, ventos, queimadas, etc.. Estas duas considerações permitem formular a hipótese de que a maioria das espécies é heliófila. As espécies presentes na América do Norte são encontradas em solos derivados de calcário.

CURY (1993) com o objetivo de analisar a diversidade de *Manihot esculenta* em áreas de agricultura autóctone do sul do Estado de São Paulo (Vale do Ribeira), através de estudos de caracterização morfológica das etnovariedades,

conseguiu estabelecer um modelo para a dinâmica evolutiva dessa cultura, além de sugerir ser a diversidade real, maior do que a reconhecida pelos agricultores, o que implica em mudanças na metodologia de coleta de germoplasma. Esse modelo, no sistema de agricultura autóctone, mantém e amplifica a variabilidade intra-específica através da ação de mutação, recombinação e fluxo gênico.

CURY (1993) identificou e caracterizou quatro áreas de agricultura autóctone no Estado de São Paulo: Icapara e Pedrinhas no litoral sul, habitadas por caiçaras; e São Pedro e Ivaporunduva, no Vale do Ribeira, habitadas por negros. O autor discute a relação entre as práticas agrícolas empregadas nessas áreas e suas implicações na conservação “in situ” das etnovariedades de mandioca.

Sete roças foram amostradas por CURY (1993), com pelo menos 24 etnovariedades de mandioca geneticamente distintas, divididas em quatro grupos feneticamente diferentes, mostrando grande diversidade genética do germoplasma coletado. Análises multivariadas mostraram não existir relação entre classificação local e identidade genética, e que também não há relação entre ambiente de coleta (local) e grupos fenéticos. Os descritores botânicos sofreram uma redução de 30 %, sem perdas significativas de informações.

2.4. Citogenética

GRANER (1935) foi o primeiro a realizar estudo citológico da mandioca (*Manihot esculenta*), através de seu clássico trabalho intitulado "Contribuição para o estudo citológico da mandioca", onde observou mais de duzentas metáfases num total de 37 variedades de mandioca, sendo que 36

apresentaram cromossomos com 1 a 2 μ de comprimento por aproximadamente 0,3 μ de largura. Observou ainda, metáfases em primeira divisão meiótica, num total de 18 cromossomos duplos.

Muito pouco se conhece a respeito da citogenética do gênero *Manihot*. Das 98 espécies descritas, apenas 20 tiveram o seu número de cromossomos determinado, que foi de 36 cromossomos para todas essas espécies. CRUZ (1968) relatou o número de cromossomos de 8 espécies selvagens (*M. androana*, *M. jolyana*, *M. tripartita*, *M. tweedieana*, *M. pedicellaris*, *M. gracilis*, *M. dichotoma* e *M. glaziovii*), encontrando $2n=36$ cromossomos para todas as espécies. CRUZ (1968) concluiu que a existência de espécies com número de cromossomos idênticos traz boas perspectivas para o melhoramento genético, tendo em vista a grande probabilidade de que cruzamentos com a mandioca sejam viáveis.

PERRY (1943) sugere que o número básico de cromossomos para o gênero *Manihot* é de $x=9$. UMANAH & HARTMANN (1973) também sugerem que duas espécies do gênero *Manihot* (*M. esculenta* e *M. glaziovii* Muell), são alopoliplóides com o número básico de cromossomos também de $x=9$.

UMANAH & HARTMANN (1973) fizeram estudos da morfologia cromossômica, comparando duas espécies *M. esculenta* e *M. glaziovii*, através do comprimento total dos cromossomos, comprimento relativo de braços, posição do centrômero e número de cromossomos satélites. Encontram para ambas as espécies, $2n=36$. O cariótipo dessas espécies foi bastante similar, com exceção do segundo par de cromossomos satélite, que apresentou comprimento médio de 3,1 μ em *M. glaziovii* e 2,2 μ em *M. esculenta*.

O estudo do comportamento cromossômico durante a meiose foi realizado por NASSAR (1978c) em sete espécies do gênero *Manihot*: *M. tripartita*, *M. anomala*, *M. zehntneri*, *M. oligantha*, *M. nana*, *M. gracilis* e *M. tomentosa* que apresentaram meiose regular com número haplóide de cromossomos $n=18$. Nenhuma associação múltipla, cromossomos retardatários ou distribuição irregular foram observadas. MAGOON, KRISHNAM e VIJAYABAI (1969, 1970) também estudaram extensivamente o comportamento meiótico em *M. esculenta* e *M. glaziovii*.

JENNINGS (1959) obteve híbridos F1 férteis a partir do cruzamento de *M. melanobasis* x *M. esculenta*, cujo conteúdo protéico foi superior ao dos progenitores. STOREY e NICHOLS (1938) conseguiram transferir resistência ao vírus do mosaico comum de *M. glaziovii* para a mandioca cultivada, salvando essa cultura da extinção no leste da África. Entretanto, poucos trabalhos têm sido feitos, no sentido de aproveitamento das espécies selvagens para a obtenção de híbridos artificiais, e os resultados são pouco encorajadores. (CARVALHO, 1995).

Experimentos realizados com espécies diferentes de *Manihot* têm mostrado fortes barreiras de incompatibilidade, devido a nem sempre os cruzamentos entre espécies do gênero *Manihot* resultarem na formação de híbridos férteis, o que sugere que o sistema de incompatibilidade segue o sistema de barreira reprodutiva proposto por HARLAN & DE WET (1971).

Com relação ao fluxo gênico, diversos trabalhos encontrados na literatura indicam que entre o cultígeno e as espécies selvagens pode ocorrer fluxo gênico. Por outro lado, SILVA JARDIM (1984) cruzando os cultivares Cateto, Vassourinha e Branca de Santa Catarina com as espécies *M. glaziovii*, *M.*

pseudoglaziovii, *M. caerulescens* e *M. pohlii* não obteve sucesso nos cruzamentos, concluindo que os cultivares e as espécies selvagens não apresentavam o mesmo conjunto gênico.

Estudos citogenéticos dos híbridos de primeira e segunda gerações entre *M. pseudoglaziovii* e *M. esculenta* foram realizados por CARVALHO (1995), com a finalidade de se estudar a causa de esterilidade com possibilidade de restaurar a fertilidade. Nos híbridos de primeira geração foram observados univalentes, cromossomos retardatários na anáfase I e tétrades com micronúcleos, sugerindo serem as prováveis causas da esterilidade. O uso de pólen não-reduzido ($2n$) foi indicado como o possível mecanismo de restauração da fertilidade. Nos híbridos de segunda geração foram encontradas aneuploidias ($2n=38$), sugerindo ser a causa da esterilidade explicada pela formação de gametas não-balanceados, resultantes da trissomia.

2.5. Caracterização Isoenzimática e Molecular

Centros nacionais e internacionais de pesquisa em agricultura têm mostrado grande interesse na caracterização e manutenção de germoplasma de mandioca, bem como, grande preocupação em aumentar, a cada ano, a coleção com a introdução de novos acessos.

O CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) na Colômbia, e o IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical) na Nigéria são os maiores colecionadores das espécies pertencentes ao gênero *Manihot*. Até 1969, o CIAT só se preocupava com a coleção sistemática dos acessos do gênero *Manihot* encontrados na Colômbia. No final de 1979, a coleção mantida pelo

CIAT era constituída de 2.512 clones originários de 13 países.(HERSHEY & AMAYA, 1989).

Um programa integrado entre CIAT-IITA foi desenvolvido na tentativa de ampliar a base genética da mandioca (*M. esculenta*) da África, introduzindo germoplasma da América do Sul. A partir de 1990, quando 87.000 sementes foram introduzidas no CIAT, ao mesmo tempo a África recebia um total de 203.000 sementes oriundas de 1.055 populações segregantes. Foram feitos testes de fitossanidade no material introduzido para evitar que material contaminado entrasse na área; assim como uma avaliação prévia do potencial agrônômico do germoplasma introduzido.(PORTO et alii, 1992).

Um outro programa está sendo conduzido no Brasil, pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias) e CIAT, com a finalidade de desenvolver materiais resistentes às regiões semi-áridas e subtropicais. (PORTO et alii., 1992).

Nicarágua, Honduras, Venezuela, Peru, Brasil, Bolívia e Paraguai são alguns dos países da América do Sul que apresentam prioridade de coleta, por serem áreas de grande diversidade de mandioca, áreas que já tiveram seu material coletado e principalmente, por representarem áreas de grande erosão genética. Dentro do Brasil, a maior preocupação na preservação do material se localiza na Bacia Amazônica, onde coletas esporádicas têm sido feitas. (GULICK et al., 1983; MORISHIMA & MARTINS, 1994).

Coleções do gênero *Manihot* são também mantidas por outros órgãos como o IITA, na Nigéria; o "Central Tuber Crops Research Institute ", em Trivandrum, Índia, e o Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), em Cruz das Almas, no Brasil.

O ideal para se manter uma coleção parece ser através de material vegetativo (estacas), com o fim de preservar o genótipo do cultivar original. Quando o material desejado não pode ser preservado dessa forma, a manutenção é feita utilizando-se cultura de tecidos (HERSHEY & AMAYA, 1989).

Para que os materiais armazenados nos bancos de germoplasma possam ser usados eficientemente pelos melhoristas, os mesmos têm que ser caracterizados e avaliados em termo de seu potencial agronômico.

A técnica de eletroforese de enzimas em gel de amido tem sido amplamente utilizada como marcador genético-bioquímico, sendo aplicada em estudos de taxonomia numérica, genética de plantas, animais e microorganismos, análise filogenética, e principalmente, na identificação e caracterização de materiais que fazem parte de coleções dos bancos de germoplasma espalhados por todo o mundo (ALFENAS et alii, 1991).

Brown & Weir (1983), citados por TANKSLEY & ORTON (1983), indicaram algumas das principais propriedades das isoenzimas para o estudo da variabilidade genética em populações de plantas que devem ser consideradas:

- A expressão alélica é codominante e livre de efeitos epistáticos ou do ambiente;
- A especificidade da enzima permite atribuir alelos para cada loco, e comparar e observar os locos apresentados pelas diferentes populações ou espécies;
- Os locos amostrados são freqüentemente determinados pela expressão do tecido e pela extração apropriada.

RAMIREZ et alii (1987) determinaram o padrão isoenzimático de diferentes variedades de mandioca (*M. esculenta* Crantz), obtidos a partir de 16

sistemas enzimáticos, através da técnica de eletroforese de enzimas em gel de poliacrilamida. O padrão enzimático observado variou conforme o tecido utilizado (folha, raiz, pecíolo, gemas foliares), apresentando maior ou menor número de bandas. Demonstraram que, dos 16 sistemas enzimáticos analisados, quatro sistemas (ACP, EST, GOT e PGI) já seriam suficientes para caracterizar o material em estudo, servindo como marcadores isoenzimáticos.

HUSSAIN et alii (1987) utilizando a técnica de eletroforese de enzimas em gel de poliacrilamida à 12% , determinaram o padrão isoenzimático específico apresentado pela enzima esterase (EST), na identificação de treze cultivares diferentes de mandioca (*M. esculenta* Crantz), com o objetivo de tornar a metodologia empregada, uma rotina na identificação de cultivares de mandioca baseada nos padrões isoenzimáticos das esterases.

LEFÈVRE & CHARRIER (1993b) descreveram a diversidade isoenzimática de 365 cultivares de *Manihot esculenta* e mais 109 acessos de parentes selvagens (*M. glaziovii* e híbridos espontâneos) da África. O estudo se baseou em dezessete locos polimórficos. *M. esculenta* e *M. glaziovii* apresentaram baixos níveis de polimorfismo, sendo a heterozigosidade estimada em 0.225 e 0.252, respectivamente. Para as espécies selvagens, a diversidade se mostrou representada por um único loco; e os multilocos revelaram um padrão geográfico. A organização da diversidade na mandioca cultivada parece não ser clara, porém, um estudo baseado em alelos raros e comuns pode levar à identificação de diferentes grupos de clones com muitos genótipos intermediários.

A técnica da eletroforese em gel de amido foi utilizada para a avaliação do nível de polimorfismo isoenzimático em duas espécies do gênero *Manihot*. Extratos crus foram obtidos de folhas não expandidas e de pólen. Para o

estudo foram analisados 365 cultivares e 109 acessos selvagens, principalmente vindos da África. A herança destas enzimas foi examinada utilizando 13 progênies intra e interespecífica. Dezesete locos polimórficos foram observados para os dez sistemas enzimáticos, com um total de 59 alelos. Todos os padrões revelados pelas enzimas mostraram herança dissômica e três grupos de ligação foram identificados. (LEFÈVRE & CHARRIER, 1993a.).

BORSOI FILHO (1995) estudou a variabilidade isoenzimática, em tecido de raiz e folha, de seis cultivares de mandioca (*M. esculenta* Crantz), em condições normais e em regime de estresse hídrico e ataque por ácaros (*Mononychellus tanajoa*). Concluiu que: 1.) os seis sistemas enzimáticos analisados (ACP, GOT, GDH, LAP, MDH e PER) foram estáveis em condições normais de ambiente e sem ataques de ácaros; 2.) os sistemas ACP, MDH e PER, não apresentaram padrões alterados, quando as plantas eram submetidas às condições de estresses; 3.) os cultivares Moça-Branca e Sete-Égua foram os que apresentaram maior divergência genética, pelo índice de Jaccard; 4.) o método de Tocher permitiu a formação de dois grupos, sendo um deles formado apenas por um cultivar.

Marcadores moleculares e isoenzimáticos constituem ferramentas úteis para a identificação e caracterização dos acessos mantidos pelos Bancos de Germoplasma de Mandioca espalhados por todo o mundo (Colômbia, Nigéria, França, Brasil, etc.), auxiliando de maneira bastante eficiente os pesquisadores que desejam trabalhar com os acessos mantidos nos Bancos. Estas técnicas facilitam o trabalho dos melhoristas, no sentido de identificar, com maior rapidez, o melhor acesso que deve ser estudado.

Técnicas moleculares vêm sendo empregadas em estudos de germoplasma de mandioca. BREECHING et alii (1993), utilizando a coleção “in vitro” do gênero *Manihot* mantida pelo Banco de Germoplasma de ORSTROM, em Montpellier (França), cujos acessos foram obtidos a partir de germoplasma africano, analisaram os cDNA dos clones de mandioca (*M. esculenta* Crantz) através da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). *M. esculenta*, *M. glaziovii* e *M. caerulea*, e alguns híbridos interespecíficos entre *M. esculenta* e *M. glaziovii* foram as espécies avaliadas por essa técnica molecular com a finalidade de detectar e medir a diversidade genética nesse material. Os clones revelaram níveis significativos de polimorfismo, tanto dentro como entre as espécies, com resultados suficientes para construir dendrogramas indicando o nível de diversidade genética presente na coleção em estudo.

2.6. Etnovariedades

Existe, atualmente, uma preocupação muito grande com o fenômeno da erosão genética em áreas de agricultura tradicional, as quais estão sendo atingidas pela modernização de técnicas agrícolas, adotando novas variedades no lugar das tradicionais.

Autores como QUIROS (1990), ALTIERI (1992), BRUSH (1992) estão preocupados com as alterações que estão ocorrendo na agricultura tradicional, provocadas pelos processos de modernização tecnológica, mudanças sociais e pela introdução de novas variedades, destacando a importância da conservação das etnovariedades para manter a diversidade genética local.

Etnovarietades ou variedades primitivas ou raças locais são definidas por Brown (1978), citado por CLEVELAND et alii (1994), como populações que possuem diferenças geográficas e ecológicas, bem como composição genética distinta tanto à nível populacional como entre populações, originadas a partir de processo de seleção local, executada pelos agricultores.

O material cultivado se originou a partir das espécies selvagens que sofreram modificações através do processo de domesticação e melhoramento genético. Grande parte dos centros mundiais de biodiversidade contém populações originais que deram origem às plantas domesticadas. Dessa forma, ALTIERI (1992) destaca a importância de se manter técnicas agrícolas tradicionais, em áreas onde a diversidade local e natural é preservada, constituindo um banco de germoplasma “in situ” da diversidade vegetal natural.

Preocupado em analisar a diversidade de espécies biológicas dentro do sistema de conhecimento indígena, e qual as consequências que as condições de agricultura moderna e as alterações sociais (culturais, demográficas, etc.) podem causar nesta diversidade, BRUSH (1992) comparou o nível de variabilidade de variedades locais e de novas variedades de batata (*Solanum spp*), em duas regiões do vale dos Andes Peruanos. Sugere que os agricultores andinos mantêm as variedades locais de batata (etnovarietades), mesmo na presença de variedades novas, enfatizando a importância de se conservar as variedades locais, para preservação da diversidade biológica da batata, evitando, desse modo, perda genética.

Trabalho na mesma linha foi realizado por CURY (1993), que analisando 32 etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta*) através da metodologia de caracteres morfológicos, originários do Vale do Ribeira e Litoral

Sul do Estado de São Paulo (Icapara, Pedrinhas, São Pedro e Ivaporunduva), chegou às seguintes conclusões:

- Presença de alta diversidade inter e intra-específica, a qual é ampliada constantemente.
- A ampliação da variabilidade intra-específica da mandioca ocorre principalmente pela interação de mecanismos evolutivos como mutação, recombinação e fluxo gênico, associadas às características da cultura que é propagada vegetativamente, embora mantenha a reprodução sexual.
- A diversidade do germoplasma da mandioca coletado é bastante grande, correspondendo a pelo menos 24 cultivares geneticamente distintos, amostrados em apenas sete roças.
- Os cultivares podem ser agrupados em pelos menos quatro grupos fenéticos.
- Não há relação entre os grupos fenéticos e locais de coleta.

QUIROS et alii (1990) estudando batata cultivada (*Solanum tuberosum* L.) em duas regiões dos Andes (centro de domesticação), concluíram ser o uso de marcadores isoenzimáticos no processo de identificação de etnovariedades, mais eficaz do que o método de taxonomia tradicional, que se baseia nas características morfológicas; e afirmam ser mais fácil quantificar a variabilidade genética com tal metodologia. Os mesmos autores também encontraram relação entre o nome das etnovariedades e as diferenças genéticas apresentadas por cada uma delas.

Grande parte dos estudos realizados utilizam o número e o nome das variedades para representar a diversidade genética. Entretanto, CLEVELAND et alii (1994) acreditam que os nomes das variedades que possuem características

genéticas diferentes não são suficientes no processo de identificação das variedades, pois, na maioria das vezes, esse nome dado pelo produtor reflete características fenotípicas do clone que, não necessariamente, podem estar expressando diferenças genéticas significativas.

Borojevic (1990), citado por CLEVELAND et alii (1994), afirma que as etnovariedades são selecionadas pelos “agricultores melhoristas” a partir das condições físicas, sociais e culturais do meio ambiente local, embora, nem sempre, essa seleção seja consciente. Dessa seleção inconsciente resultam variedades que apresentam maior variabilidade genética do que as variedades novas melhoradas que são introduzidas no local.

Alguns autores como CLEVELAND et alii (1994) atribuem essa variação genética ao número de alelos por loco, que pode variar de um a vários alelos por loco para um mesmo indivíduo; e esse aumento de indivíduos que apresentam alta proporção de locos com vários alelos, conseqüentemente eleva o nível de heterozigosidade alterando, desse modo, a variabilidade genética da população. Esta variação provavelmente está relacionada com a natureza do processo de seleção (seleção massal).

Os agricultores, na maioria das vezes, mantêm as etnovariedades mesmo na presença de novas variedades. O motivo que leva o produtor a essa prática cultural ainda não foi bem discutido nem pesquisado, porém, alguns pontos podem ser considerados, como: armazenamento do material para alimento e nutrição; por razões históricas, culturais e sociais do local; cerimônias religiosas, etc.(CLEVELAND et alii, 1994).

VAUGHAN & CHANG (1992) mostraram que os agricultores manejam as variedades existentes e criam novas, com o emprego de técnicas

variáveis. Estas técnicas incluem a coleção e domesticação de espécies selvagens, cruzando as espécies selvagens com as variedades cultivadas, pelo processo de hibridação; plantação padronizada para controlar a polinização; remoção no campo de plantas indesejáveis, e seleção de sementes que serão replantadas. Esses agricultores melhoristas também obtêm novas variedades a partir de mutações espontâneas que ocorrem no material do campo. Dessa maneira, os agricultores demonstram seu papel ativo e importante no melhoramento de plantas, criando e mantendo a diversidade genética da cultura.

Outros autores como Amanor et alii (1993), Berg et alii (1991) e Clades et alii (1994), citados por CLEVELAND et alii (1994), mostram o papel de destaque das etnovariedades para o desenvolvimento da agricultura sustentável, não somente pelo conteúdo de informações genéticas contidas no DNA dessas variedades primitivas, mas também pelas preciosas informações a respeito da história da cultura e do local onde se encontram.

Plucknett et alii (1987), citados por CLEVELAND et alii (1994), destacam a importância de se conservar as etnovariedades ou variedades primitivas, por se constituírem em fontes de variabilidade genética, principalmente para características únicas, não apresentadas pelas variedades melhoradas, devendo essa diversidade genética local ser preservada para o desenvolvimento e manutenção de novas variedades locais.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. MATERIAL

3.1.1. Germoplasma Utilizado

O material analisado foi coletado no mês de junho de 1990, em quatro diferentes áreas do Vale do Ribeira e Litoral Sul Paulista: Icapara, no município de Iguape, Pedrinhas, no município de Ilha Comprida, e São Pedro e Ivaporunduva, no município de Eldorado Paulista.(CURY, 1993).

Em cada localidade foram escolhidas, ao acaso, algumas roças, sendo que em cada roça foram coletadas todas as etnovariedades identificadas pelo agricultor. Cada etnovariedade foi considerada como um clone, e as estacas foram colhidas de uma ou no máximo de duas plantas. O cultivar Mantiqueira foi incluído para comparação. (Tabela 1).

TABELA 1. Relação das etnovariedades analisadas de *Manihot esculenta*. As etnovariedades estão listadas segundo o número de identificação, local de coleta, roça, nome local, uso e origem do material.

Número Identificação	Localidade/ roça	Nome Local	Uso	Origem
1	Pedrinhas-1	Mandipoia	Farinha	Local
2		Branca	Farinha	Local
3		Cascuda	Farinha	Local
4		São Pedro	Farinha	Local
5		Aipim 5 min.	Mesa	Local
6		Aipim preto	Mesa	Local
7	Pedrinhas-2	Aipim preto	Mesa	Pariquera
8		Aipim amarelinho	Mesa	Serra Parati
9		Cascuda	Farinha	Local
10		Branca	Farinha	Local
11		Aipim 5 min.	Mesa	Local
12	Icapara-1	Amarelinha	Farinha	Local
13		Mand. amarela	Mesa/Farinha	Local
14		Jurema	Farinha	Local
15		Aipim 5 min.	Mesa	Rio Verde
16	Icapara-2	Cascuda	Farinha	Local
17		Jurema	Farinha	Local
18		Sem Nome	-----	-----

TABELA 1. Continuação

Número Identificação	Localidade/ Roça	Nome Local	Uso	Origem
19	São Pedro-1	Variedade de semente	-----	-----
20		Ruiva	Farinha	Local
21		S. Pedro Grande	Farinha	Local
22		Vassourinha	Farinha	Local
23		Pão do Céu	Mesa/Farinha	Intr. 8 anos
24		Aipim vela	Mesa/Farinha	Intr. 8 anos
25		S. Pedrinho	Farinha	Local
26	Ivaporunduva-1	Aipim roxo	Mesa/Farinha	Local
27		Gema de ovo	Mesa	Local
28		Pão do Céu	Mesa	Local
29	Ivaporunduva-2	Vassourinha	Mesa/Farinha	Local
30		Roxa	Mesa/Farinha	Local
31	Campinas/IAC	Mantiqueira	-----	Campinas

3.1.2. Localização das áreas de coleta do material

As etnovariedades utilizadas foram provenientes de 4 áreas do Vale do Ribeira e Litoral Sul Paulista: Icapara, no município de Iguape, Pedrinhas, no

município de Ilha Comprida, e São Pedro e Ivaporunduva no município de Eldorado Paulista.

Icapara é considerado um distrito de Iguape, que se localiza às margens do Mar Pequeno ou de Iguape. O acesso se dá por estrada vicinal que sai de Iguape e margeia o Mar Pequeno no sentido leste, distando aproximadamente 10 km da zona urbana de Iguape.

Pedrinhas é um distrito de Ilha Comprida, que fica à 33 Km de Iguape, no sentido sul, margeando a praia, localizado no Mar Pequeno. O acesso a essa área é feito via Iguape ou Cananéia. As duas roças, das quais foram retiradas 10 variedades, ficam numa vila que dista 3 km no sentido do interior da ilha.

São Pedro e Ivaporunduva são bairros rurais localizados no município de Eldorado Paulista. O acesso se dá através da estrada intermunicipal que liga Eldorado a Iporanga (44 km até a travessia do Rio Ribeira). Do ponto de desembarque, 3 km a leste fica o bairro de Ivaporunduva, e 6 km à oeste, o bairro de São Pedro. (CURY, 1993).

A partir desse material, foram colhidas as manivas e plantadas no campo do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo- ESALQ/USP - Piracicaba-SP, em novembro de 1993, seguindo o mesmo espaçamento e práticas culturais adotadas por CURY (1993).

3.1.2. Tecidos das plantas para eletroforese de isoenzimas

Para a extração das enzimas, foram utilizadas plantas adultas (com aproximadamente 8 meses de idade) das quais foram retiradas folhas recém

expandidas de cada uma das etnovariedades analisadas. Essas folhas pesaram, em média, 0.3 gramas. Essas mesmas plantas foram mantidas no campo após retiradas as folhas para a extração.

3.2. MÉTODOS

Uma etapa preliminar, para a definição e refinamento dos protocolos de eletroforese de enzimas para *Manihot esculenta*, foi necessária devido à existência de pouquíssimas referências bibliográficas relacionadas às técnicas de eletroforese de isoenzimas, no gênero *Manihot*.

Após essa etapa de definição de metodologia de laboratório, procedeu-se a etapa de avaliações genéticas com base em padrões de isoenzimas.

3.2.1. Análises eletroforéticas

Após os testes preliminares, optou-se por desenvolver os sistemas enzimáticos relacionados a seguir: Malato Desidrogenase (MDH- E.C. 1.1.1.37), Leucina aminopeptidase (LAP- E.C. 3.4.11.1), Xiquimato desidrogenase (SKDH- E.C. 1.1.1.25), Aspartato aminotransferase (AAT- E.C. 2.6.1.1), Peroxidase (PER- E.C. 1.11.1.7) e alfa-esterase (Alfa-EST- E.C. 3.1.1.1). Estes sistemas foram os que apresentaram os melhores resultados nos tecidos foliares analisados, com seus respectivos códigos (E.C.) da “Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (1976)”.

3.2.1.1. Extração de isoenzimas

Para a extração das isoenzimas foram utilizados, para cada amostra, 30 mg de tecido foliar e 3 gotas de tampão de extração, segundo SCANDALIOS (1969), apresentado a seguir:-

- Tampão Tris 0,1 M pH 7.5	200 ml
- Sacarose 0.2 M	6.892 g
- P.V.P. (PolivinilPirrolidona)	1.20 g
- E.D.T.A. 1mM	0.6724 g
- Albumina Bovina	0.2 g
- Mercaptoetanol	10 UI

O tecido foliar foi macerado em placas de acrílico com bastão de vidro, em ambiente com temperatura ao redor de 20°C, para evitar a desnaturação das isoenzimas.

3.2.1.2. Procedimentos de eletroforese

A técnica de eletroforese baseou-se na migração das isoenzimas em géis de penetrose 30 à 13%, em camadas horizontais, dentro de balcão frigorífico, com temperatura ao redor de 3°C.

Os sistemas tampão gel/eletrodo utilizados são os apresentados na tabela 2.

TABELA 2. Sistemas tampão gel/eletrodo para os diferentes sistemas enzimáticos analisados.

ENZIMA	TAMPÃO	REFERÊNCIA
- MDH - LAP - AAT - PER	Citrato-Morfolina (CM) <u>Eletrodo</u> :- 0.04 M ácido cítrico, pH 6.1 titulado com N-(3aminopropil)morfolina <u>Gel</u> :- diluição de 1:20 do Tampão do eletrodo	CLAYTON & TRETIK (1972).
-SKDH - Alfa-EST	Tris Citrato (TC) <u>Eletrodo</u> :- 0.223 M de Tris 0.086 M de ácido cítrico, pH 7.5, titulado com NaOH <u>Gel</u> :- diluição para 3.5% do Tampão do eletrodo	SOLTIS et alii (1983)

Para a corrida eletroforética foi feita uma pré-corrida, onde utilizou-se 20 mA de corrente constante e voltagem de 80 volts para o sistema TC, e 100 volts para o sistema CM. Após 30 minutos do início da corrida, os papéis de filtro contendo as amostras de isoenzimas foram retirados, e aumentado o sistema de corrente, que passou para 40 mA de corrente constante e voltagem de 160 volts para o sistema TC, e 250 volts para o sistema CM. Em ambos os casos, o tempo de corrida foi de 7 horas, quando a frente do marcador de bromofenol atingia 10 cm de migração, a partir do ponto de aplicação das amostras.

A camada suporte utilizada para a eletroforese foi de gel de penetrose 30 de milho, a uma concentração de 13%.

Os sistemas enzimáticos empregados para o estudo foram:

- malato desidrogenase (MDH) - E.C. 1.1.1.37
- leucina aminopeptidase (LAP) - E.C. 3.4.11.1
- xiquimato desidrogenase (SKDH) - E.C. 1.1.1.25
- alfa-esterase (Alfa-EST) - E.C. 3.1.1.1
- peroxidase (PER) - E.C. 1.11.1.7
- aspartato aminotransferase (AAT) - E.C. 2.6.1.1

Terminada a corrida eletroforética, os géis foram cortados em 5 fatias de aproximadamente 2.0 mm de espessura. Para os géis do sistema CM de CLAYTON & TRETIAK (1972), a primeira camada (superior) foi eliminada, a segunda foi utilizada para coloração da aspartato aminotransferase (AAT), a terceira para malato desidrogenase (MDH), a quarta para leucina aminopeptidase (LAP) e a quinta para peroxidase (PER). No caso dos géis do sistema TC de SOLTIS et alii (1983), as duas primeiras camadas e a quinta camada foram desprezadas, sendo a terceira utilizada para a coloração da xiquimato desidrogenase (SKDH), e a quarta para a alfa-esterase (Alfa-EST).

Os protocolos utilizados na revelação das isoenzimas sofreram modificações a partir de: SOLTIS et alii (1983), para LAP e AAT; YAMADA & GURIES (1985), para MDH e SKDH, e SCANDALIOS (1969), para Alfa-EST e PER e, são apresentados a seguir:

- Alfa- Esterase (Alfa-EST) - E.C. 3.1.1.1

Solução A:

- Alfa-Naftil Acetato	02 ml
- Tampão fosfato de sódio, pH 6.0	80 ml

Solução B:

- Fast Blue RR Salt	80 mg
- N-Propanol	05 ml
- Tampão fosfato de sódio, pH 6.0	20 ml

Procedimento:- O gel foi mergulhado na solução A por 20 minutos, após o período, adicionou-se a solução B; tempo de revelação: 40 minutos; Temperatura: 37°C.

- Aspartato Aminotransferase (AAT) - E.C. 2.6.1.1

- Ácido L-aspartico	150 mg
- Ácido alfa-cetoglutárico	100 mg
- Tris HCl 0.2 M, pH 8.0 (q.s.p.)	100 ml

Ajuste o pH para 8.0, com NaOH, e adicione:

- Piridoxal - 5 - fosfato	05 mg
- Fast Blue BB salt	100 mg

Procedimento:- O gel foi mergulhado nessa solução e incubado no escuro à 37°C, até o aparecimento das bandas; tempo de revelação: 50 minutos.

- Leucina Aminopeptidase (LAP) - E.C. 3.4.11.1

- L-Leucil-Beta-naftilamida-HCl	15 mg
- Fast Black K salt	30 mg
- Tampão Tris-maleato, pH 6.0	100 ml

Procedimento: diluíram-se os dois reagentes no tampão e os géis foram mergulhados na solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 60 minutos; temperatura: 37°C.

- Malato Desidrogenase (MDH) - E.C. 1.1.1.37

- DL-Ácido málico 0.5 M, pH 8.0	04 ml
- MTT	10 mg
- NAD ⁺	20 mg
- PMS	02 mg
- Tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	100 ml

Procedimento: Todos os reagentes de coloração foram diluídos no tampão e a este foi acrescentado a solução do substrato; os géis foram mergulhados na

solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 45 minutos; temperatura: 37°C.

- Xiquimato Desidrogenase (SKDH) - E.C. 1.1.1.25

- Ácido Xiquímico	100 mg
- MTT	10 mg
- NADP ⁺	10 mg
- PMS	02 mg
- Tampão Tris HCl 0.1 M, pH 8.5	100 ml

Procedimento: Misturaram-se todos os reagentes e posteriormente os géis foram mergulhados nesta solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 40 minutos; temperatura: 37°C.

- Peroxidase (PER) - E.C. 1.11.1.7

- Ortodianisidina	05 mg
- Etanol 95%	35 ml
- Tampão fosfato 0.1 M, pH 6.0	14 ml
- Água oxigenada - 30%	01 ml

Procedimento: Todos os reagentes de coloração foram diluídos no tampão e os géis incubados nessa solução, e após 10 minutos foi acrescentada a água

solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 45 minutos; temperatura: 37°C.

- Xiquimato Desidrogenase (SKDH) - E.C. 1.1.1.25

- Ácido Xiquímico	100 mg
- MTT	10 mg
- NADP ⁺	10 mg
- PMS	02 mg
- Tampão Tris HCl 0.1 M, pH 8.5	100 ml

Procedimento: Misturaram-se todos os reagentes e posteriormente os géis foram mergulhados nesta solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 40 minutos; temperatura: 37°C.

- Peroxidase (PER) - E.C. 1.11.1.7

- Ortodianisidina	05 mg
- Etanol 95%	35 ml
- Tampão fosfato 0.1 M, pH 6.0	14 ml
- Água oxigenada - 30%	01 ml

Procedimento: Todos os reagentes de coloração foram diluídos no tampão e os géis incubados nessa solução, e após 10 minutos foi acrescentada a água

oxigenada; os géis foram novamente mergulhados na solução e incubados no escuro; tempo de revelação: 15 minutos; temperatura: 37°C.

Reveladas as isoenzimas os géis foram lavados com água destilada e fixados em solução de glicerina a 10%, por 15 minutos e armazenados em plásticos.

3.2.1.3. Leitura dos zimogramas

Após a fixação dos géis, fez-se a leitura dos zimogramas colocando-se filme plástico sobre o gel, onde foram feitos os desenhos das bandas presentes nos géis com canetas de retroprojctor, guardando as dimensões e migrações originais. O parâmetro utilizado foi o RM (Migração Relativa), descrita por CHELIAK & PITEL (1984). O RM de cada sistema enzimático foi obtido pela divisão da distância migrada por uma molécula enzimática qualquer (banda presente no gel), pela distância migrada pela banda padrão. Considerou-se como banda padrão, aquela que apareceu com maior frequência, constância e nitidez em todos os indivíduos. O uso de uma banda padrão fixada permite comparar cada banda do próprio indivíduo que teve as mesmas condições de migração de correntes da localização no gel.

Uma vez calculado o RM para cada banda de cada sistema enzimático, foi possível avaliar o nível de segregação e determinar os locos de cada sistema enzimático analisado.

3.2.2. Análise genético-biométrica

Em uma pesquisa, quando se optar por utilização de alguma técnica de análise multivariada, não basta simplesmente adotar um certo programa computacional que execute os cálculos, e delegar ao computador a missão de fornecer todos os resultados. Antes de empregar o computador na análise, é necessário que o pesquisador reflita sobre o tipo de dados disponíveis e entenda o que cada uma das técnicas de análise pode lhe oferecer. É preciso discutir se os dados serão utilizados tal como foram mensurados, ou se devem estar sujeitos a alguma transformação que os tornem mais adequados ao propósito da análise, relatados por CURI¹.

Seguindo a linha de raciocínio proposta por CURI¹, os dados bioquímicos foram analisados por diferentes metodologias de taxonomia numérica:

- Análise comparativa de coeficientes de similaridade entre unidades quando as variáveis são qualitativas de duplo estado (ou variáveis binárias), presença ou ausência, concomitante com as características entre indivíduos, roças e locais de coleta. Esse tipo de análise foi feita através da análise de similaridade, utilizando programa de Taxonomia Numérica, denominado NTSYS-pc System (ROHLL, 1988), pelo qual pudemos avaliar o grau de similaridade pelos métodos de "Simple Matching" e "Jaccard", obtendo fenogramas por diferentes métodos de agrupamento, sendo o principal deles o U.P.G.M.A. (Unweighted pair-group method, arithmetic average).

¹CURI, P.R. (FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu) Comunicação pessoal, 1994.

Análise de Distância Genética e estimadores de Diversidade Genética: - Os métodos utilizados foram os existentes no programa BIOSYS-1, desenvolvido por SWOFFORD & SELANDER (1989), para a identificação dos diferentes locos apresentados pelos sistema enzimáticos analisados, seus alelos e a frequência dos mesmos em situações de homozigose e heterozigose. Para se estimar o polimorfismo de um determinado loco, considerou-se como tal aquele cuja frequência do alelo mais comum não ultrapassava 0.95.

SNEATH & SOKAL (1973) apresentaram os principais coeficientes de similaridade ou de associação, dentre eles, os mais utilizados são os coeficientes de associação de Jaccard (1908) e o “Simple Matching”.

O coeficiente de associação “Simple Matching” (SM) utiliza tanto as concordâncias positivas como as negativas no numerador ($SM = m/p$, onde “p” se refere ao número de variáveis, e “m” indica as concordâncias positivas e/ou negativas). O coeficiente de similaridade de “Jaccard” utiliza como numerador somente as concordâncias positivas ($J = a / (p - d)$, onde “a” indica as concordâncias positivas (variáveis presentes em ambas as unidade X_i e X_i'); “d” as concordâncias negativas (variáveis ausentes em ambas as unidades X_i e X_i'); e “p” se refere ao conjunto das variáveis estudadas. Quanto maior a semelhança entre as unidades, maior será o valor do coeficiente de associação.

Os dados consistem de “p” variáveis ($a + b + c + d$) anotados nas unidades X_i e X_i' , onde “a” é o número de concordâncias positivas ($X_i=+$ e $X_i'=+$), “d” é o número de concordâncias negativas ($X_i=-$ e $X_i'=-$), e “b” e “c” indicam as discordâncias ($+-$ e $-+$, respectivamente). Os sinais + e - na tabela 2 x 2 para cálculo do coeficiente de associação podem representar presença e

ausência de uma estrutura, ou dois estados alternativos quaisquer dos caracteres. Por isso, a indicação do estado + pode ser bastante arbitrária.(CURI, 1991).

UNIDADE X_i	UNIDADE X_i'		TOTAL
	+	-	
+	a	b	a + b
-	c	d	c + d
TOTAL	a+c	b+d	p

onde: $m = a + d =$ concordâncias

$u = b + c =$ discordâncias

$p =$ conjunto de variáveis

Cada indivíduo de uma amostra multivariada pode ser considerado como um ponto em um Espaço Euclidiano Multidimensional. (CURI, 1991). Os processos classificatórios têm por objetivo agrupar esses pontos em conjuntos que mostrem aspectos marcantes da amostra. A Análise de Agrupamento (“Cluster Analysis”) é um desses métodos que diante de um conjunto de unidades, conhecidas por uma listagem de seus caracteres, objetiva encontrar a melhor maneira de descrever seus padrões de similaridade mútuas, constituindo classes de indivíduos similares que originarão os agrupamentos. Essa técnica de avaliação numérica de afinidade ou de similaridade entre unidades (OTU - Unidades Taxonômicas Operacionais) e de ordenação dessas unidades com base nas suas afinidades foi denominada por SNEATH & SOKAL (1973), de Taxonomia Numérica.

O agrupamento pode ser aglomerativo ou divisivo. No nosso estudo foi utilizado o aglomerativo, que parte de “n” unidades separadas e as agrupam

em conjuntos sucessivos até que, na última etapa todas as unidades estejam colocadas em um só conjunto.

O agrupamento aglomerativo, por sua vez, pode ser ou não hierárquico. A estratégia hierárquica foi a utilizada no presente estudo, a qual otimiza um caminho entre a população e os indivíduos que a compõem. Caminho este definido por fusões progressivas que começam com os indivíduos e terminam com o conjunto todo agrupado. Geralmente as fusões são dicotômicas com os grupos sendo formados aos pares. Como resultado, os agrupamentos maiores serão mais heterogêneos que os menores, e qualquer membro de um grupo com nível hierárquico mais baixo (grupos menores) será também membro de um grupo com nível mais elevado (grupo maiores).

Dentre os principais algoritmos utilizados na Análise de Agrupamento, destaca-se o U.P.G.M.A. (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average). Segundo CURI (1991), o método não ponderado de agrupamento aos pares usando médias aritméticas é a estratégia mais utilizada, sendo espaço conservativo. A distância entre dois agrupamentos “J” e “K” é definida como $d_{J \text{ e } K} = (1/(n_J * n_K)) * \sum d_{j,k}$; onde j pertencente J e k pertencente K.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Procedimentos de eletroforese e padrões de isoenzimas

Procedimentos diferentes foram utilizados, com a finalidade de se obter os protocolos definitivos de eletroforese para o material (*M. esculenta*) do presente estudo. Diferentes tecidos foram testados (folhas recém expandidas, raízes e pecíolos), e dentre eles o que apresentou melhor resultado foi o tecido foliar. Diversas soluções de extração também foram testadas.

Nos tecidos foliares, existem grandes quantidades de substâncias fenólicas que dificultam o processo de extração. Para se obter uma boa extração em folhas, é necessário utilizar tecidos jovens e pouco lignificados. A solução de extração que melhor resultado apresentou foi a de SCANDALIOS (1969), com a adição de mercaptoetanol. (Ver item 3.2.1.1).

Extrações a partir de tecidos foliares resultaram em padrões de bandas nítidas e com boas resoluções, com a vantagem de não precisar destruir os indivíduos para se proceder a extração, pois somente as folhas recém expandidas eram retiradas permanecendo as plantas intactas para futuras avaliações e acompanhamentos, tanto de campo como de laboratório.

RAMIREZ et alii (1987) apresentaram protocolos desenvolvidos para *Manihot esculenta* Crantz. Preliminarmente, estes foram testados, mas com

pouco sucesso para as condições de laboratório e material utilizado no presente trabalho. Os autores acima citados utilizaram plântulas com dois meses de idade e, neste trabalho, foram utilizados materiais com mais de oito meses de idade.

Outras metodologias de corridas para eletroforese de enzimas são encontradas na literatura, tais como os protocolos de LEFÈVRE & CHARRIER (1993a), desenvolvidos para *Manihot esculenta* e *Manihot glaziovii*, e os de HUSSAIN et alii (1987) também para *M. esculenta*. Todavia, os protocolos que melhores resultados apresentaram foram os sistema-tampão tris citrato (TC) de SOLTIS et alii (1983); e sistema-tampão citrato-morfolina (CM), de CLAYTON & TRETIAK (1972).

A maioria dos sistemas enzimáticos estudados em *Manihot esculenta* Crantz parece não apresentar padrões diferentes de bandas quando se utilizam folhas mais jovens (recém expandidas) ou adultas. Somente o sistema das alfa-esterases apresentou alguma variação de bandas, de acordo com o estágio de desenvolvimento da folha. Por esta razão, optou-se por folhas recém expandidas.

Dentre os sistemas enzimáticos estudados, os que melhores resultados apresentaram foram: MDH, PER, Alfa-EST, LAP, SKDH e AAT.

- Malato Desidrogenase (MDH - E.C. 1.1.1.37)

A enzima apresentou boa atividade no tecido estudado sendo que os padrões de bandas obtidos a partir de folhas recém expandidas foram excelentes. *Manihot esculenta* para esse sistema enzimático apresentou 3 locos enzimáticos distintos (MDH-1, MDH-2 e MDH-3), sendo os locos MDH-1 e MDH-2 monomórficos, com número de bandas igual a um. A enzima MDH é dimérica,

sendo que o loco MDH-3 apresenta de uma a duas bandas; o fenótipo do zimograma de um heterozigoto apresenta duas bandas.

- Peroxidase (PER - E.C. 1.11.1.7)

A peroxidase ocorre em folhas recém expandidas de plantas com até um ano de idade. Possui atividades anódica e catódica. O heterozigoto apresenta um padrão monomérico (1 subunidade polipeptídica). Por apresentar padrões isoenzimáticos uniformes (ausência de polimorfismo) para todas as variedades avaliadas, não foi considerado para análise.

- Alfa-Esterase (Alfa-EST - E.C. 3.1.1.1)

As alfa-esterases mostraram atividade enzimática intensa no tecido foliar utilizado. Apresentaram 4 locos enzimáticos distintos (EST-1, EST-2, EST-3 e EST-4), e do ponto de vista estrutural, o heterozigoto possui um padrão monomérico (1 subunidade polipeptídica). O loco EST-4 se caracterizou por apresentar padrão monomórfico de bandas para todas as variedades.

- Leucina Aminopeptidase (LAP - E.C. 3.4.11.1)

Este sistema enzimático se caracterizou por apresentar 2 locos enzimáticos (LAP-1 e LAP-2), com o mais rápido possuindo atividade bastante intensa quando comparado ao loco mais lento. O heterozigoto é monomérico (1 subunidade polipeptídica). O padrão fenotípico característico de um heterozigoto é representado por duas bandas isoenzimáticas (a mais lenta e a mais rápida dentro do mesmo loco).

- Xiquimato Desidrogenase (SKDH - E.C. 1.1.1.25)

Esta enzima apresentou somente um loco enzimático, o SKDH-1 com 4 alelos, no material estudado, e o heterozigoto é monomérico (1 subunidade polipeptídica). A atividade enzimática foi bastante intensa para todas as variedades. O número de bandas apresentado por indivíduo varia de 1 a 2 bandas, conforme a variedade.

- Aspartato Aminotransferase (AAT- E.C. 2.6.1.1)

O padrão de resolução apresentado por essa enzima foi muito bom. Foram encontrados dois locos, tendo o loco mais rápido (AAT-1) apresentado atividade mais intensa que o loco mais lento (AAT-2). O loco AAT-2 se caracterizou por apresentar 3 alelos codominantes. Estruturalmente a enzima é formada por duas subunidades polipeptídicas (enzima dimérica).

As figuras de 1 a 5 ilustram esquematicamente os padrões eletroforéticos observados nos géis que permitiram análise não duvidosa e cujos locos foram determinados a partir dos RM (Migração Relativa), com base no alelo mais freqüente, para cada um dos cinco sistemas enzimáticos analisados. Foram detectados doze locos, num total de 26 alelos para todos os sistemas estudados, nas 30 etnovariedades analisadas no presente estudo e no cultivar Mantiqueira..

Com base nos resultados obtidos para os sistemas enzimáticos testados, optou-se por utilizar 5 sistemas (LAP, MDH, AAT, SKDH e Alfa-EST), que apresentaram os melhores padrões de zimogramas, para o tecido em estudo. O sistema enzimático das Peroxidases (PER) foi descartado por não apresentar polimorfismo isoenzimático.

Figura 1. Zimograma dos padrões eletroforéticos apresentando os fenótipos do sistema enzimático da malato desidrogenase (MDH), analisados em folhas recém expandidas de sete populações de *M. esculenta* do Estado de São Paulo, com seus respectivos locos, alelos e valores de referência.

Figura 2. Zimograma dos padrões eletroforéticos apresentando os fenótipos do sistema enzimático da alfa esterase (α -EST), analisados em folhas recém expandidas de sete populações de *M. esculenta* do Estado de São Paulo, com seus respectivos locos, alelos e valores de referência.

Figura 3. Zimograma dos padrões eletroforéticos apresentando os fenótipos do sistema enzimático da xiquimato desidrogenase (SKDH), analisados em folhas recém expandidas de sete populações de *M. esculenta* do Estado de São Paulo, com seus respectivos locos, alelos e valores de referência.

Figura 4. Zimograma dos padrões eletroforéticos apresentando os fenótipos do sistema enzimático da leucil aminopeptidase (LAP), analisados em folhas recém expandidas de sete populações de *M. esculenta* do Estado de São Paulo, com seus respectivos locos, alelos e valores de referência.

Figura 5. Zimograma dos padrões eletroforéticos apresentando os fenótipos do sistema enzimático da aspartato aminotransferase (AAT), analisados em folhas recém expandidas de sete populações de *M. esculenta* do Estado de São Paulo, com seus respectivos locos, alelos e valores de referência.

4.2. Interpretação genética de zimogramas

A literatura aponta pouquíssimos trabalhos que apresentam padrões genéticos que utilizam a técnica da eletroforese de enzimas em espécies do gênero *Manihot*, tais como os de LEFÈVRE & CHARRIER (1993), RAMIREZ et alii (1987), HUSSAIN et alii (1987) e BORSOI FILHO (1995).

O sistema malato desidrogenase (MDH - E.C. 1.1.1.37) apresentou 3 locos isoenzimáticos (MDH-1, MDH-2, MDH-3). O loco MDH-1 é monomórfico, com 1 banda. O loco MDH-2 é também monomórfico com uma banda. A enzima MDH é dimérica, sendo que o loco MDH-3 apresenta de uma a duas bandas, variando de acordo com a etnovarietade analisada. Foram detectados cinco fenótipos diferentes, que podem ser observados na figura 1.

Os padrões de zimogramas encontrados no presente estudo são semelhantes aos descritos por LEFÈVRE & CHARRIER (1993) que propuseram três níveis de interpretação para o sistema enzimático da malato desidrogenase (MDH): os níveis A e B foram interpretados como produtos de um único gene, representado por uma única banda no gel, com padrão monomórfico; e o nível C foi considerado como produto dimérico de um único gene (1 a 3 bandas). De maneira geral, a mandioca cultivada (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta 3 locos isoenzimáticos para MDH. Do ponto de vista estrutural, esta enzima apresenta configuração molecular dimérica, sem bandas heterozigotas entre locos.

Por outro lado, os resultados apresentados por BORSOI FILHO (1995), que trabalhou com diferentes cultivares de mandioca, mostraram duas regiões de atividades enzimáticas para o sistema MDH. A região considerada mais rápida, denominada MDH-1, sugere ser um único loco com três bandas,

enquanto que a região mais lenta, denominada de MDH-2, o autor suspeita existir mais de um loco, com um total de quatro bandas. A interpretação enzimática dada pelo autor está em discordância com a interpretação apresentada por LEFÈVRE & CHARRIER (1993) e com a interpretação feita neste trabalho quanto ao número de alelos por loco, e número de locos obtidos. No caso do presente estudo, o resultado encontrado foi superior ao observado pelo autor, apresentando, portanto, maior variabilidade genética nas populações analisadas.

A complexidade da interpretação do controle genético da enzima MDH (malato desidrogenase) normalmente tem levado os pesquisadores a utilizarem com segurança de análise, a interpretação de um a no máximo dois locos para este sistema. (KHEPHART, 1990).

O sistema enzimático das alfa-esterases (Alfa-EST - E.C. 3.1.1.1.) apresentou 4 locos (EST-1, EST-2, EST-3 e EST-4), num total de 7 alelos (A_1 e A_2 , B_1 e B_2 , C_1 e C_2 , D), conforme esquema apresentado na figura 2. O loco EST-4 é monomórfico, com uma banda. Os demais locos possuem uma ou duas bandas, de acordo com o padrão característico da variedade; uma banda, indivíduo homozigoto, duas bandas indivíduo heterozigoto. Este sistema se caracterizou por sugerir 11 fenótipos diferentes, tendo as etnovariedades 1, 21, 22, 24 e 27 padrões fenotípicos específicos para cada uma delas. O sistema das alfa-EST é importante para identificação das variedades por possuir o maior número de locos e maior índice de polimorfismo.

HUSSAIN et alii (1987) já haviam sugerido o sistema das esterases, porém em gel de poliacrilamida, como um sistema que poderia ser utilizado na identificação de cultivares de mandioca, por apresentar padrões isoenzimáticos específicos de acordo com o genótipo analisado. Segundo esses pesquisadores,

esse sistema foi selecionado como marcador de variedades na identificação de rotina de variedades de mandioca. O mesmo fato foi comprovado em nossos estudos, porém em gel de penetrose 30 à 13%.

RAMIREZ et alii (1987) também sugerem o sistema das esterases como um marcador molecular na identificação de variedades de mandioca (*Manihot esculenta*). Mostram ser a esterase, um grupo complexo de isoenzimas que apresenta ampla variabilidade na zona de migração mais rápida com pouca variação observada entre os diferentes tecidos analisados no material estudado.

O loco EST-4, que se caracterizou por apresentar um único alelo (o alelo D) e padrão monomórfico de bandas, é observado tanto nas 30 etnovariedades como na variedade Mantiqueira (variedade melhorada), avaliadas no presente estudo; e, esse mesmo padrão monomórfico foi também encontrado por LEFÈVRE & CHARRIER (1993a), sendo que, no caso, os autores denominaram de loco A (alelo A₁), considerado o mais lento de todos os locos. Este alelo D, assim denominado em nosso estudo, se mostrou fixo nas populações avaliadas, uma vez que todos os clones analisados apresentaram esse alelo. Esse resultado também foi observado pelos mesmos autores, vindo a confirmar nossas interpretações isoenzimáticas.

Para o sistema da xiquimato desidrogenase (SKDH - E.C. 1.1.1.25), foi constatado a presença de um único loco gênico (SKDH-1) com 4 alelos. Esse loco se apresenta com alto grau de polimorfismo isoenzimático em relação aos seus alelos.

Baseado em dados de literatura, LEFÈVRE & CHARRIER (1993) também observaram a presença de um único loco gênico, monomérico, com 4

alelos codominantes, em *Manihot esculenta*, em conformidade com o presente trabalho.

O sistema xiquimato desidrogenase (SKDH - E.C. 1.1.1.25) apresentou 7 fenótipos distintos, como pode ser observado na figura 3. O número de bandas variou de 1 a 2 bandas. Os heterozigotos são monoméricos e representados por 2 bandas no gel.

Alguns autores como Hodgkin et alii (1993); Borejevic (1990), citados por CLEVELAND et alii (1994), caracterizam a variação genética encontrada nos materiais provenientes de agricultura tradicional, pela presença de vários alelos por loco, por indivíduo, resultando em elevados níveis de heterozigosidade. Dessa forma, o sistema xiquimato desidrogenase (SKDH - E.C.1.1.1.25) analisado no presente estudo confirma a premissa relatada pelos autores, por apresentar um único loco com quatro alelos.

Leucina aminopeptidase (LAP - E.C. 3.4.11.1) foi o sistema enzimático que apresentou dois locos gênicos (LAP-1 e LAP-2). O loco LAP-1 se caracterizou por possuir dois alelos; e o loco LAP-2 por apresentar três alelos (B_1 , B_2 e B_3) (figura 4), sendo o alelo B_3 o de menor frequência (0,16), pois só as etnovariedades 2, 3, 10, 16 e 19 possuem esse alelo num total de 30 etnovariedades analisadas no presente trabalho. O alelo B_1 desse mesmo loco LAP-2, é o de maior frequência (1.0), observado em todos os clones analisados.

LEFÈVRE & CHARRIER (1993a), estudando a herança genética de 17 locos isoenzimáticos em *M. esculenta* Crantz, apresentaram padrões isoenzimáticos diferentes dos observados no presente estudo para o sistema da leucina aminopeptidase. Os autores encontraram apenas um loco gênico (AMP-A) com 3 alelos (A_1 , A_2 e A_3).

Conforme pode ser observado na figura 4, o sistema enzimático da leucina aminopeptidase (E.C. 3.4.11.1) apresentou 5 fenótipos distintos.

O sistema da aspartato aminotransferase (AAT - E.C. 2.6.1.1) apresentou dois locos gênicos (AAT- 1 e AAT-2). O loco AAT-1 apresentou 2 alelos e o loco AAT-2, 3 alelos. A estrutura enzimática da AAT é dimérica de acordo com as citações de LEFÈVRE & CHARRIER (1993) e KEPHART (1990).

Os padrões de zimogramas encontrados no sistema AAT, do presente estudo, são relativamente similares aos padrões observados em *Manihot esculenta* por LEFÈVRE & CHARRIER (1993), com exceção do loco AAT-A, que apresentou um único alelo.

Para o sistema da aspartato aminotransferase (AAT - E.C. 2.6.1.1), foram observados cinco padrões fenotípicos diferentes, mostrando ser esse sistema um importante marcador molecular na identificação de cultivares da mandioca (*M. esculenta*). Esses resultados estão de acordo com as citações de RAMIREZ et alii (1987) que também reconheceram o sistema da GOT ou AAT como um marcador molecular em potencial, para o material cultivado.

As etnovariedades 15 (Aipim 5 minutos) e 29 (Vassourinha) são as únicas a apresentarem o alelo B₃, o menos freqüente nas populações estudadas, novamente confirmando a sugestão feita por RAMIREZ et alii (1987), de que o sistema AAT-E.C. 2.6.1.1 poderia ser bastante útil na discriminação e identificação de variedades de mandioca.

Por outro lado, BORSOI FILHO (1995), em seu trabalho, sugere não haver variação intraclonal dos padrões isoenzimáticos em

nenhum dos cultivares de *Manihot esculenta* por ele estudado para o sistema Glutamato oxalacético transaminase (GOT ou AAT).

4.3. Parâmetros Genético-Biométricos em populações de *Manihot esculenta*.

4.3.1. Análise da Variabilidade Genética em roças (populações clonais) de *M. esculenta*.

HAMRICK (1985) relata que as medidas mais comumente utilizadas para se estimar os níveis de variabilidade intrapopulacional, quando se trabalha com isoenzimas, são a porcentagem de locos polimórficos, o número de alelos por loco e a heterozigosidade média.

A presença da variabilidade genética dentro das populações tem a função de propiciar aos indivíduos, adaptação imediata e também a flexibilidade para expressar fenótipos distintos em situações temporárias de estresses, garantindo a sobrevivência.(MARCON, 1988).

Para a estimativa da distância genética e diversidade genética foram utilizados os métodos existentes no programa BIOSYS-1, desenvolvido por SWOFFORD & SELANDER (1989), na determinação da frequência alélica dos 12 locos isoenzimáticos obtidos, num total de 26 alelos, a partir de cinco sistemas enzimáticos em tecidos foliares de *M. esculenta*, pertencentes à sete roças (populações) de duas regiões ecogeográficas do Estado de São Paulo. Os resultados encontrados são apresentados na tabela 3.

TABELA 3. Frequência alélica nas 7 roças (populações) de *Manihot esculenta*, nos 12 locos isoenzimáticos identificados.

Locos	Populações						
	1	2	3	4	5	6	7
SKDH-1							
(N)	6	5	4	3	7	3	2
A ₁	0.500	0.400	0.250	0.500	0.214	0.000	0.250
A ₂	0.500	0.600	0.250	0.333	0.000	0.000	0.000
A ₃	0.000	0.000	0.375	0.000	0.429	0.667	0.500
A ₄	0.000	0.000	0.125	0.167	0.357	0.333	0.250
MDH-1							
(N)	6	5	4	3	7	3	2
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
MDH-2							
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
MDH-3							
C ₁	0.583	0.800	0.750	0.500	0.929	0.833	1.000
C ₂	0.333	0.200	0.250	0.500	0.071	0.167	0.000
C ₃	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
EST-1							
(N)	6	5	4	3	7	3	2
A ₁	0.750	0.700	0.500	0.500	0.429	0.667	0.750
A ₂	0.250	0.300	0.500	0.500	0.571	0.333	0.250
EST-2							
B ₁	0.750	0.500	0.625	0.167	0.714	0.833	1.000
B ₂	0.250	0.500	0.375	0.833	0.286	0.167	0.000
EST-3							
C ₁	0.667	1.000	1.000	1.000	0.857	0.667	1.000
C ₂	0.333	0.000	0.000	0.0000	0.143	0.333	0.000
EST-4							
D	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
LAP-1							
(N)	6	5	4	3	7	3	2
A ₁	0.583	0.800	0.750	1.000	0.786	0.500	0.500
A ₂	0.417	0.200	0.250	0.000	0.214	0.500	0.500
LAP-2							
B ₁	0.833	0.800	1.000	0.833	0.929	1.000	1.000
B ₂	0.167	0.100	0.0000	0.167	0.071	0.000	0.000
B ₃	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AAT-1							
(N)	6	5	4	3	7	3	2
A ₁	0.677	0.800	0.750	1.000	1.000	0.667	1.000
A ₂	0.333	0.200	0.250	0.000	0.000	0.333	0.000
AAT-2							
B ₁	0.917	1.000	0.750	1.000	0.857	0.667	0.750
B ₂	0.083	0.000	0.125	0.000	0.143	0.333	0.000
B ₃	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.250

N= número de clones analisados por população.

Neste trabalho, população pode ser definida como um conjunto de etnovariedades diferentes (clones), que são propagadas vegetativamente, sendo que cada conjunto desse (uma população) pertence a uma roça diferente, que constitui a unidade básica de estudo.

CURY (1993) relata que na agricultura autóctone, de modo geral, as roças de mandioca se formam a partir de clareiras em meio à vegetação natural, podendo considerar a população da espécie cultivada como uma população referencial, na qual atuam os processos evolutivos.

Os locos MDH-1, MDH-2 e EST-4 apresentaram padrões monomórficos nas populações avaliadas, com frequência de 1.0 (ou de 100%) indicando estarem fixados nas roças do presente trabalho. Os demais locos analisados nos diferentes sistemas enzimáticos apresentaram polimorfismo.

A frequência dos alelos por loco nas populações estudadas de mandioca, de modo geral, apresentou valores semelhantes, com exceção para o alelo B₃ do loco LAP-2 com uma frequência de 10% na população 2 (roça Pedrinhas-2), o qual não foi detectado nas demais populações; e para o alelo C₃ do loco MDH-3 que ocorreu na frequência de 8,3%, na população 1 (roça Pedrinhas-1), e que também não foi observado nas outras populações. (Tabela 3). Alguns autores como ALFENAS et alii (1991) acreditam que o percentual de frequência de alelos raros é variável conforme a origem das populações.

As roças ou populações 1 e 2 que apresentaram os alelos raros pertencem à região do litoral, indicando divergência genética em relação às populações pertencentes àquelas localizadas na região de vale.

MARCON (1988) relata que a frequência de um alelo específico depende do aumento ou da diminuição da frequência do genótipo portador desse

alelo. E que a seleção natural atua sobre o fenótipo como um todo e os alelos raros são ou não favorecidos, de acordo com seu valor adaptativo relativo com que participa na expressão do fenótipo.

Uma das características fundamentais da agricultura autóctone, segundo alguns autores como CURY (1993), é que ela não diminui as pressões de seleção natural. A não utilização de corretivos, fertilizantes, pesticidas e irrigação fazem com que o ambiente fique sujeito a fortes pressões de seleção. E para que os indivíduos que apresentam alelos raros, dentro de uma população, se estabeleçam na população, é necessário a intervenção do homem através da propagação vegetativa, que no cultivo da mandioca, é uma prática comum e obrigatória. Desta forma, tanto as etnovariedades estabelecidas ou fixadas, quanto os novos recombinantes estão sujeitos à pressão da seleção natural.

A composição genética de populações é determinada pelas frequências alélicas e genotípicas, sendo que alterações nessas frequências sustentam a base dos processos evolutivos. E para comparar populações de uma mesma espécie, é necessário transformar as frequências alélicas dos locos em números que mostrem a variação na população. (MARCON, 1988).

Segundo CURY (1993), sistema de agricultura praticada pelos caiçaras e negros proporciona condições favoráveis à seleção de novos recombinantes, resultantes da hibridação intra-específica.

A variabilidade genética observada nas populações de *M. esculenta*, para os 12 locos estudados, em termos de número médio de alelos, porcentagem de locos polimórficos, e heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e), é apresentado na tabela 4.

Tabela 4. Variabilidade genética observada em sete roças (populações) de *Manihot esculenta* Crantz, para os 12 locos analisados.

POPULAÇÃO	TAMANHO DA AMOSTRA MÉDIA POR LOCO	NÚMERO MÉDIO DE ALELOS POR LOCO	PORCENTAGEM DE LOCOS POLIMÓRFICOS (0.95) *	HETEROZIGOSIDADE MÉDIA OBSERVADA (H_o)	HETEROZIGOSIDADE MÉDIA ESPERADA (H_e) **
1. PEDRINHAS-1	6.0	1.8 (0.2)	75.0	0.250 (0.083)	0.327 (0.066)
2. PEDRINHAS-2	5.0	1.7 (0.2)	58.3	0.233 (0.073)	0.250 (0.066)
3. ICAPARA-1	4.0	1.8 (0.3)	58.3	0.271 (0.095)	0.307 (0.084)
4. ICAPARA-2	3.0	1.5 (0.2)	41.7	0.306 (0.126)	0.217 (0.083)
5. SÃO PEDRO-1	7.0	1.8 (0.2)	66.7	0.190 (0.064)	0.236 (0.067)
6. IVAPORUNDUVA-1	3.0	1.7 (0.1)	66.7	0.194 (0.096)	0.328 (0.074)
7. IVAPORUNDUVA-2	2.0	1.4 (0.2)	33.3	0.250 (0.115)	0.208 (0.092)

* Um loco é considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum não exceder a 0.95.

** A heterozigosidade média esperada (H_e) foi baseada na estimativa de NEI (1978).

*** Os números entre parênteses referem-se aos desvios padrões.

O número de alelos por loco apresenta variação de acordo com a população. As populações Pedrinhas-1 (roça 1), Icapara-1 (roça 3) e São Pedro-1 (roça 5) apresentam número médio de alelos por loco igual a 1.8. As populações Pedrinhas-2 (roça 2) e Ivaporunduva-1 (roça 6) apresentam, em média, 1,7 alelos por loco. Icapara-2 (roça 4) e Ivaporunduva-2 (roça 7) têm médias com valores iguais a 1.5 e 1.4 alelo/loco, respectivamente.

A variabilidade genética medida pelo número médio de alelos por loco, nas populações estudadas, manteve-se relativamente baixo, ao redor de 1,7 alelos por loco, considerando os cinco sistemas enzimáticos analisados, embora não se possa afirmar com segurança que esse número de alelos por loco observado

seja baixo, uma vez que na literatura não existem dados com mandioca, para comparação dos resultados.(Tabela 4).

Dentre os sistemas enzimáticos que apresentam maior número de alelos por loco destaca-se, em primeiro lugar, o da xiquimato desidrogenase (SKDH - E.C. 1.1.1.25) que apresentou quatro alelos por loco; em seguida, o sistema da malato desidrogenase (MDH - E.C. 1.1.1.37) com o loco MDH-3 com três alelos, o sistema leucina aminopeptidase (LAP - E.C. 3.4.11.1) e aspartato aminotransferase (AAT - E.C. 2.6.1.1.) também com três alelos, correspondendo aos locos LAP-2 e AAT-2, respectivamente. Esses dados mostram a variabilidade genética presente no material estudado.

A proporção de locos polimórficos encontrada nas populações estudadas foi relativamente alta nos sistemas enzimáticos analisados, utilizando-se o critério de que um loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 0.95. De acordo com esse critério, a roça Pedrinhas-1 apresentou 75.0% de locos polimórficos, sugerindo ser a população que possui o maior índice de diversidade. Nas roças São Pedro-1 e Ivaporunduva-1, observaram-se valores de 66.7% de locos polimórficos. As roças Pedrinhas-2 e Icapara-1 tiveram seus valores ao redor de 58.3% de locos polimórficos. A roça Icapara-2 apresentou 41,7% de polimorfismo a nível de locos. E a roça Ivaporunduva-2 apresentou valor ao redor de 33.3% de locos polimórficos, demonstrando ser a roça com o menor nível de variabilidade isoenzimática.(Tabela 4).

Estes resultados fornecem indicações de que a maior parte da variabilidade genética está concentrada dentro das populações de mandioca estudadas. Na literatura existente sobre estimativa da variabilidade genética em

populações naturais de *Manihot esculenta*, são utilizadas outras metodologias, não permitindo comparação com estes resultados.

A porcentagem de locos polimórficos foi maior no grupo de populações que habitam a região do litoral (58.3%) e um pouco menor nas populações que se encontram na região do vale (50.0%). Segundo os dados obtidos por CURY (1993), que avaliou as mesmas etnovariedades do presente estudo, porém utilizando dados morfológicas, a roça São Pedro-1 (região do vale) foi a que apresentou maior diversidade genética, seguida de Pedrinhas-1, Icapara-1, Pedrinhas-2, Icapara-2 e Ivaporunduva-1.

Ao contrário dos dados obtidos por CURY (1993), o presente estudo baseado na análise dos padrões isoenzimáticos observados em cinco sistemas enzimáticos mostra a roça Pedrinhas-1 (região do litoral), como sendo a que apresentou a maior variabilidade genética, seguida pelas roças São Pedro-1, Ivaporunduva-1, Pedrinhas-2, Icapara-1, Icapara-2 e Ivaporunduva-2. (Tabela 4).

A discordância dos resultados obtidos por CURY (1993) com o presente estudo sugere que o índice de diversidade obtido a partir da análise de características fenotípicas não foi o mesmo observado a partir da análise de características isoenzimáticas, vindo a confirmar as sugestões feitas por CLEVELAND et alii (1994), de que os nomes e/ou as regiões onde são encontradas as variedades primitivas, normalmente, refletem diferenças fenotípicas à nível de população, que pode ser o resultado de diferenças genéticas significativas, não concentrando e demonstrando, obrigatoriamente, a diversidade genética da população, sugerindo um estudo de análise de natureza isoenzimática para comprovar a variabilidade genética do material.

Por outro lado, discordâncias entre avaliações utilizando características morfológicas e isoenzimáticas da diversidade ocorrem em diversas espécies (JAIN, 1992). Por exemplo, MILLAR (1986), revisando a questão, relatou que em muitas coníferas a variação para caracteres morfológicos e fisiológicos é bem maior que para caracteres isoenzimáticos.

NEVO et alii (1979) também observaram pouca correlação entre variação enzimática e a morfométrica em plantas cultivadas, argumentando que nessas espécies as pressões de seleção durante a domesticação ocorrem sobre os caracteres botânico-agronômicos e não sobre os isoenzimáticos.

Os valores de heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) estimados para as populações não se apresentam na mesma ordem para as sete populações (roças de 1 a 7), o que reflete na ocorrência de endogamia. A população 6 (Roça Ivaporunduva-1) parece ser a mais endogâmica entre todas ($H_o=0,194$ e $H_e=0,328$). A população 4 (roça Icapara-2) foi a que apresentou o maior valor de heterozigosidade média observada ($H_o=0,306$); seguida da população 7 (roça Ivaporunduva-2) com $H_o=0,250$, com valores de desvio padrão iguais a 0,126 e 0,115, respectivamente. As demais roças apresentaram desvio padrão com valores intermediários, quando comparado aos valores de heterozigosidade média observada e esperada. Estes resultados indicam a existência de diferenças genéticas entre as etnovariedades de uma mesma roça e entre roças e entre as regiões ecogeográficas.

LEFÈVRE & CHARRIER (1993b) apresentam valores para 365 acessos de *Manihot esculenta* e 109 acessos da espécie silvestre *Manihot glaziovii*, onde a heterozigosidade média foi de 0,225 e 0,252, respectivamente. O valor médio da variabilidade genética encontrado nas populações de mandioca do

Vale do Ribeira (litoral sul do Estado de São Paulo) foi de 0,242, portanto superior à média de variabilidade estimada pelos autores.

CURY (1993) já havia constatado ser a roça Ivaporunduva-1 (população 6), a que apresentava menor índice de diversidade genética, entre todas as populações avaliadas. O mesmo autor acredita que tanto a fecundação cruzada como a autofecundação são mecanismos amplificadores de variabilidade genética da população, porém afirma ser a autofecundação limitada pela alta frequência e inviabilidade de genótipos, devido a forte depressão endogâmica presente em populações naturais.

A agricultura autóctone, cujas bases técnicas remontam ao período pré-colonial, guardam em suas populações grande diversidade intra-específica das espécies cultivadas. A mandioca é a principal espécie cultivada neste tipo de agricultura. Alguns autores como CHERNELA (1986) relacionam a diversidade intra-específica com a diversidade cultural do local, embora sejam raros os trabalhos que relatam as causas da diversidade intra-específica da mandioca.

BRUSH (1992) enfatizou a importância de se conservar a diversidade local e manter as práticas agrícolas tradicionais paralelas com as práticas agrícolas modernas, que muito contribuem para o aumento e manutenção da variabilidade, evitando dessa forma, a erosão genética.

ROGERS (1965 e 1973) afirma em seus relatos que nas áreas onde o material cultivado (*M. esculenta*) é mantido, são encontradas numerosas espécies silvestres as quais podem se cruzar com os cultivares presentes nesses locais e originar raças colonizadoras, chegando a conclusão que o processo de domesticação da mandioca ocorreu simultaneamente em várias regiões.

A grande variabilidade fenotípica observada em mandioca deve estar relacionada com o caráter perene da espécie, aos modos de reprodução vegetativa e sexual (alogamia), à dispersão e armazenamento das sementes no solo, que permitem a introdução de novos recombinantes no conjunto original de variabilidade da espécie.

De um modo geral, as frequências alélicas obtidas a partir da análise de cinco sistemas enzimáticos foram semelhantes às frequências fenotípicas obtidas a partir de padrões de bandas observados nos géis para cada um dos sistemas enzimáticos utilizados, como pode ser comprovado na tabela 5. As populações pertencentes à região do vale (populações 5, 6 e 7) mostraram divergências de frequências em relação às populações do litoral (1, 2, 3 e 4), apresentando duas bandas que se mostraram ausentes nas populações do vale.

Por outro lado, existem bandas que são específicas de uma única população (população 1), apresentado pelo sistema das alfa esterases (Alfa-EST), dentro de uma mesma região. (Tabela 5).

TABELA 5. Frequência fenotípica (% de bandas presentes no gel) das 26 bandas observadas no gel, para os cinco sistemas enzimáticos analisados, nas sete populações de *M. esculenta*.

ENZIMA	BANDA	POPULAÇÕES						
	RM	1	2	3	4	5	6	7
MDH	0.56	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.49	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.43	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.39	0.33	0.60	0.00	0.00	0.14	0.33	0.50
	0.37	0.67	0.20	0.50	0.67	0.14	0.00	0.00
	0.33	0.67	0.40	0.50	1.00	0.14	0.33	0.00
EST	0.68	1.00	1.00	1.00	1.00	0.29	1.00	1.00
	0.61	0.50	0.60	1.00	1.00	0.86	0.67	0.50
	0.53	0.83	0.80	0.75	0.33	1.00	1.00	1.00
	0.49	0.33	0.80	0.50	1.00	0.57	0.33	0.00
	0.41	0.67	1.00	1.00	1.00	0.86	0.67	1.00
	0.37	0.33	0.00	0.00	0.00	0.14	0.33	0.00
	0.16	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SKDH	0.45	0.67	0.60	0.50	1.00	0.29	0.00	0.50
	0.42	0.67	0.80	0.50	0.67	0.00	0.00	0.00
	0.36	0.17	0.00	0.25	0.00	0.43	0.67	1.00
	0.33	0.17	0.40	0.25	0.33	0.43	0.33	0.50
LAP	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.93	0.83	0.40	0.50	0.00	0.43	1.00	1.00
	0.81	0.33	0.20	0.00	0.33	0.14	0.00	0.00
	0.68	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.65	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GOT	0.37	0.67	0.80	0.75	1.00	1.00	0.67	1.00
	0.34	0.33	0.20	0.25	0.00	0.00	0.33	0.00
	0.21	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	1.00
	0.19	0.17	0.00	0.25	0.00	0.29	0.33	0.00
N		6	5	4	3	7	3	2

N = número de clones por população

4.3.2. Análise de Agrupamento - Padrões de Similaridade

Para a análise comparativa de variáveis binárias ou de duplo estado (presença e ausência de bandas), concomitante com as características qualitativas entre variedades, roças e locais de coleta, foi utilizado o programa de Taxonomia Numérica, denominado NTSYS-pc System (ROLHF, 1988). O grau de similaridade avaliado pela análise de agrupamento utilizando-se os coeficientes de similaridade “Simple Matching” (SM) e “Jaccard” (J), pode ser observado nas figuras 6 e 7, através de dendrogramas obtidos a partir do algoritmo U.P.G.M.A.

A Análise de Agrupamento utilizando-se o coeficiente “Simple Matching” (SM) permitiu a caracterização de pelo menos 3 grandes grupos distintos quanto à similaridade de comportamento para o conjunto das variedades de *M. esculenta* do presente estudo.

Em um extremo situaram-se as variedades pertencentes às roças localizadas na região do litoral (Pedrinhas-1, Pedrinhas-2 (região de Ilha Comprida), Icapara-1 e Icapara-2 (região de Iguape)). Um grupo intermediário também constituiu-se pelas roças localizadas na região do litoral (Pedrinhas-1 e Pedrinhas-2); enquanto que no extremo oposto, localizaram-se as variedades pertencentes às roças da região do vale (São Pedro-1, Ivaporunduva-1 e Ivaporunduva-2). Com exceção das etnovariedades 13 (Mandioca amarela) e 15 (Aipim 5 minutos) que provêm da roça localizada na região do litoral (Icapara-2), as demais etnovariedades agrupadas neste terceiro grupo pertencem às roças da região de vale, como pode ser constatado na figura 6.

FIGURA 6. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento das 30 etnovariedades, utilizando-se coeficiente “Simple Matching” de Similaridade, e algoritmo U.P.G.M.A.

FIGURA 7. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento das 30 etnovariedades, utilizando-se coeficiente “Jaccard” de Similaridade, e algoritmo U.P.G.M.A.

Pedrinhas-1 e Pedrinhas-2, roças localizadas na Ilha Comprida (região de Cananéia) e Icapara-1 e Icapara-2, roças localizadas na região de Iguape apresentaram similaridade de bandas, no que se refere às características qualitativas, originando um único grupo. Geograficamente, ambas situam-se às margens de Iguape, apresentando as mesmas condições de clima, solo, tratos culturais, temperatura média anual (21,4°C), população com o mesmo nível sócio-econômico, o que provavelmente, influenciou a configuração do agrupamento. O resultado observado está de acordo com os critérios adotados por CHERNELA (1986) que relaciona a diversidade intra-específica com a estrutura social do local.

O grupo formado pelas etnovariedades presentes nas roças localizadas na região de vale se caracteriza pelo sistema de agricultura das comunidades negras. Ivaporunduva-1 e 2 e São Pedro-1 são roças pertencentes às comunidades negras tradicionais localizadas, respectivamente, às margens do Rio Ribeira e a poucos quilômetros do rio (região de vale). A época de plantio, colheita, corte de vegetação, tratos culturais, solo, clima, etc. apresentam-se semelhantes, embora as roças de Ivaporunduva apresentem agricultura de subsistência que está sendo substituída pela agricultura comercial da banana. (CURY, 1993).

CURY (1993), em seu trabalho, relatou que, os agricultores das roças tradicionais recebem por comportamento cultural etnovariedades de mandioca de outras regiões, o que poderia justificar a similaridade de bandas isoenzimáticas encontradas entre as variedades 7 (Aipim preto), 9 (Cascuda), 11 e 15 (Aipim 5 minutos) e 13 (Mandioca amarela) da região de litoral com os padrões de bandas observados nas variedades pertencentes à região de vale

(Município de Eldorado Paulista), fazendo com que todas essas variedades fizessem parte de um mesmo grupo, o grupo do extremo oposto.(Figuras 1 e 2).

As etnovariedades 4 (São Pedro), 5 (Aipim 5 minutos) e 8 (Aipim amarelinho) formam um grupo intermediário, pertencentes às roças que se localizam na região de litoral. O resultado observado nos dendrogramas (figuras 6 e 7) para esse grupo intermediário pode ser justificado pelo fato dos agricultores terem o costume de plantar várias etnovariedades por roça, e distribuí-las de maneira aleatória no campo, favorecendo a hibridação intra-específica, o que pode gerar recombinantes sujeitos à pressão de seleção natural.

Introgressões naturais entre o cultígeno e as espécies selvagens do gênero *Manihot* ocorrem espontaneamente através de cruzamentos interespecíficos, favorecendo o fluxo gênico. CURY (1993) relata que a agricultura autóctone, criando uma área de perturbação na vegetação natural, favorece a simpatria entre o cultígeno e as espécies selvagens do gênero *Manihot*, facilitando, desse modo, a troca de genes entre as diferentes espécies por meio de hibridação introgressiva, fenômeno responsável pela amplificação da variabilidade dentro das roças. Dessa forma, os caiçaras e negros criam condições favoráveis à hibridação interespecífica e a seleção natural dos prováveis recombinantes.

A alocação da etnovariedade 27 (Gema de ovo) da região de Ivaporunduva (roça Ivaporunduva-1) em um grupo individual mostra falta de semelhança dessa etnovariedade com as demais, demonstrando a efetiva manutenção da diversidade genética dentro das roças de agricultura autóctone.

A análise de agrupamento que utilizou o coeficiente “Jaccard” (J) também permitiu a caracterização de 3 grupos distintos, apresentando

dendrograma semelhante ao obtido pela análise de agrupamento que utilizou o coeficiente “Simple Matching” (SM). As variedades analisadas por esse coeficiente (J) formaram grupos praticamente idênticos, com exceção da variedade 15 (Aipim 5 minutos) que se agrupou um pouco mais distante, porém ainda fazendo parte do mesmo grande grupo de etnovariedades.

Comparando os dois coeficientes usados - SM e J - figuras 6 e 7, nota-se que praticamente nenhuma alteração significativa é observada nos agrupamentos formados, demonstrando a eficiência da análise e da metodologia empregadas.

Algumas das variedades estudadas apresentam sinonímia quanto ao nome local, como pode ser verificado na tabela 1. As variedades 14 e 17, denominadas de Jurema, apresentaram identidade fenética (figura 6 e 7), e o mesmo foi observado por CURY (1993) em suas análises. As demais variedades não apresentaram relação de sinonímia, e são elas; 5, 11 e 15 denominadas de Aipim 5 minutos; 3, 9 e 16 denominadas de Cascuda; 2 e 10 denominadas Branca; 22 e 29 denominadas Vassourinha; 23 e 28 denominadas Pão do Céu e as variedades 6 e 7 denominadas Aimpim preto.

Os resultados obtidos através da análise de agrupamento foram semelhantes aos observados na análise de variabilidade genética (frequência alélica), no que diz respeito à separação das variedades de acordo com a distribuição geográfica: grupo das variedades pertencentes à região de litoral e grupo pertencente à região de vale.

CURY (1993), utilizando distância euclidiana média com dados quantitativos obtidos a partir de vinte descritores morfológicos, obteve 4 a 5 grupos fenotípicos distintos. No presente estudo, foi feita análise de agrupamento

que utilizou os coeficientes “Simple Matching” e “Jaccard”, entre etnovariedades, a partir de dados isoenzimáticos (características qualitativas), obtendo 4 grupos fenéticos, sendo que não foi observada repetição das etnovariedades que compõem os grupos formados a partir da análise feita por Cury e o presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e discutidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a.** Entre os sistemas enzimáticos utilizados, aspartato aminotransferase mostrou-se como marcador bioquímico indicado para identificação de etnovariedades de mandioca.
- b.** Num total de doze locos observados, nove se mostraram polimórficos, apresentando, em média, 1.7 alelos/loco.
- c.** A porcentagem de locos polimórficos foi maior no grupo de roças da região do litoral, e menor nas roças da região do vale.
- d.** O valor da heterozigosidade média encontrado nas roças de mandioca do litoral sul do Estado de São Paulo, analisadas, foi de 0,242, valor superior ao encontrado na literatura.

- e. A diversidade genética do germoplasma de mandioca observada nas roças é grande, destacando-se a importância de se manter a diversidade local para diminuir os efeitos da erosão genética.
- f. As etnovariedades 14 e 17 denominadas Jurema apresentam identidade fenética. As demais variedades que apresentam sinonímias locais não apresentam identidade genética com o nome local.
- g. As etnovariedades podem ser agrupadas em três grupos fenéticos.
- h. Os resultados obtidos através da análise de agrupamento foram semelhantes aos observados na análise de variabilidade genética baseado em padrões de distribuição geográfica: grupo das etnovariedades pertencentes à região de litoral e grupo das etnovariedades pertencentes à região de vale.
- i. Dados de isoenzimas servem para auxiliar os melhoristas nas estratégias de melhoramento genético de mandioca, na agricultura autóctone, no sentido de detectar a distribuição da variabilidade genética presente nas populações que compõem as roças.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I. ; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais**. Viçosa, UFV, 1991. 242p.
- ALLEM, A.C. *Manihot esculenta* is a native of the neotropics. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, **71**: 22-4, 1987.
- ALLEM, A.C. A revision of *Manihot* section *Quinquelobae* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **49**(1): 1-26, 1989a.
- ALLEM, A.C. Four new species of *Manihot* (Euphorbiaceae) from Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, **49**(3): 649-62, 1989b.
- ALTIERI, M.A. El control ecológico de la biodiversidad en agroecosistemas. **Agroecologia y Desarrollo**, **4**:2-11, 1992.
- BORSOI FILHO, J.L. Variabilidade isoenzimática e divergência genética de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Viçosa, 1995. 52 p. (Doutorado - Universidade Federal de Viçosa).

- BREECHING, J.R.; MARNEY, P. ; GAVALDA, M.A.; NOIROT, M.; HAYSOM, H.R.; HUGHES, M.A.; CHARRIER, A. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Germplasm using molecular marker. **Annals of Botany**, **72**: 515-20, 1993.
- BRONSON, B. Roots and the subsistence of the ancient Maya. **Swest. Journal of Anthropology**, **22**: 251-79, 1966.
- BRUSH, S.B. Ethnoecology, biodiversity, and modernization in Andean potato agriculture. **Journal Ethnobiology**, **12**(2): 161-185, 1992.
- DE CANDOLLE. On the study of species, considered as to their origin, their early cultivation, and the principal facts of their dissuasion. In: **Origin of Cultivated Plants**. New York, Hafner, 1886. p. 59-63.
- CARVALHO, C.G.P. Hibridação interespecífica da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com espécies afins. Viçosa, 1995. 56p. ("Magister Scientiae" - Universidade Federal de Viçosa).
- CHELIAK, W.N. & PITEL, J.A. **Techniques for starch gel Electrophoresis of Enzymes from Forest Tree Species**. Pataya National Forestry Institute, Canadian Forestry Service Information Report PI-X-42, 1984. 49p.

- CHERNELA, J.M. Os cultivares de mandioca na área dos Uapés (Tukâno). In: RIBEIRO, B.G. **Suma etnológica brasileira**. Petrópolis, Vozes, 1986. p.151-71.
- CLAYTON, J. & TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **J. Fisheries Res.Board Can.**, **29**: 1169-1172, 1972.
- CLEVELAND, D.A.; SOLERI, D. ; SMITH, E.S. Do folk crop varieties have a role in Sustainable Agriculture? **BioScience**, Washington, **44**(11): 740-51, 1994.
- CRUZ, N.D.da. Citologia do gênero *Manihot* Adams. I. Determinação do número de cromossomos em algumas espécies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, **40**(1): 91-5, 1968.
- CURI, P.R. **Metodologia da Pesquisa Científica**. Botucatu, FMVZ, 1991. 259 p.
- CURY, R. Dinâmica evolutiva e caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), na agricultura autóctone do Sul do Estado de São Paulo. Piracicaba, 1993. 103 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz"/USP).
- GRANER, E.A. Contribuição para o estudo citológico da mandioca. Piracicaba, ESALQ/Departamento de Genética, 1935. 28p.

- GRATTAPAGLIA, D.; NASSAR, M.A.; DIANESE, J.C. Biossistemática de espécies brasileiras do gênero *Manihot* baseada em padrões de proteína da semente. **Ciência e Cultura**, São Paulo, **39**(3): 294-300, 1987.
- GULICK, P.; HERSHEY, C.; ALCAZAR, E. Genetic Resources of cassava and wild relatives. AGPG:IBPGR/82/111, Rome, 1983. p.56.
- GUTIERREZ, M.M. The Orinoco estuary (Colombia): an area of high diversity of bitter cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, **75/76**: 27-8, 1988.
- HAMRICK, J.L. Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations. In: SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S., ed. **Isozyme in Plant Biology**. Portland. Dioscorides Press, 1985. p. 87-105.
- HARLAN, J.R. Agricultural origins; Centers and noncenters. **Science**, Washington, **174**: 468-74, 1971.
- HARLAN, J.R. & DE WET, M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, **20**(4): 509-17, 1971.
- HARLAN, J.R. **Crops and Man**. Madison, ASA, 1975. p.295.

- HERSHEY, C. & AMAYA, A. Germoplasma de yuca: Evolución, distribución y colección. In: DOMINGUEZ, C.E. **Yuca: investigación, producción y utilización**. Cali, CIAT, 1989. p. 77-9.
- HUNTER, R.L. & MARKERT, C. L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, **125**: 1294-5, 1957.
- HUSSAIN, A.; BUSHUK, W.; RAMIREZ, H.; ROCA, W. Identification of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes. **Seed Science & Technology**, **15**: 19-22, 1987.
- JAIN, S.K. Population management in new plant breeding approaches. In: JAIN, S.K. & BOTSFORD, L.W., eds. **Applied population biology**. Kluwer Academic Dorchecht Publishers. 1992. p.
- JENNINGS, D.L. *Manihot melanobasis* Müll-Arg. - a useful parent for cassava breeding. **Euphytica**, Wageningen, **8**: 157-63, 1959.
- JENNING, D.L. Cassava. In: SIMMONDS, N.W. **Evolution of crop Plants**. London, Longman, 1979. p. 81-4.
- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, New York, **77(5)**: 693-712, 1990.

- LEFÈVRE, F. & CHARRIER, A. Heredity of seventeen isozyme loci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, Dordrecht, **66**(3): 171-8, 1993a.
- LEFÈVRE, F. & CHARRIER, A. Isozymes diversity within Africa *Manihot* germplasm. **Euphytica**, Dordrecht, **66**(1/2): 73-80, 1993b.
- McMILLIN, D.E. Plant Isozymes: A historical perspective. In: TANKSLEY, D.S. & ORTON, T.J. **Isozyme in plant genetic and breeding.** , Amsterdam, Elsevier, 1983. pt. A, p. 3-13.
- MAGOON, M.L.; KRISHNAN, R.; VIJAYA BAI, K. Morphology of the pachytene chromosome and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytology**, Tokyo, **34**: 612-24, 1969.
- MARCON, G. Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H.B.K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, 1988. 179 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MILLAR, C.I. The Californian closed cone pinus (subsection *Oocarpae* little and critchfield): a taxonomic history and review. **Taxon**, Utrecht, **35**(4): 657-70, 1986.

- MORISHIMA, H. & MARTINS, P.S. Investigation of plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza*. The Manbusho International Scientific Research Program, Mishima, Japan, 1994. 100p.
- NASSAR, N.M.A. Conservation of the genetics resources of cassava (*Manihot esculenta*): determination of wild species localities with emphasis on probable origin. **Economic Botany**, Bronx, **32**: 311-20, 1978a.
- NASSAR, N.M.A. Microcenters of wild cassava, *Manihot* spp. diversity in Central Brasil. **Turrialba**, Costa Rica, **28**(4): 345-7, 1978b.
- NASSAR, N.M.A. Genetic resource of cassava: 4-chromosome behaviour in some wild *Manihot* species. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, **38**(1): 135-7, 1978c.
- NASSAR, N.M.A. *Manihot neusana* Nassar: a new species native to Paraná, Brasil. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, **65**: 1097-100, 1985.
- NEVO, E.; ZOHAY, D.; BROWN, A.H.D.; HABER, M. Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Israel. **Evolution**, Lawrence, **33**: 815-33, 1979.
- NORMANHA, E.S. O trabalho de melhoramento de mandioca no Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo. **O Agrônômico**, Campinas, **23**: 91-100, 1971.

PIMENTEL, D. ; STACHOW, U.; TAKACS, D.A.; BRUBAKER, H.W.;
 DUMAS, A.R.; MEANEY, J.J.; O'NEAL, J.A.S.; ONSI, D.E.; CORZILIUS,
 D.B. Conserving biological diversity in agricultural/forestry systems.
BioScience, Washington, **42**: 354-62, 1992.

PERRY, B.A. Chromosome number and phylogenetic relationship in the
 Euphorbiaceae. **American Journal of Botany**, New York, **30**: 527-43,
 1943.

PLUCKNETT, D.I. International agriculture research for the next century.
BioScience, **43**: 432-40, 1993.

PORTO, M.C.M.; ASIENDU, R. IITA-CIAT initiative for the movement of
 germplasm. **Cassava Newsletter**, **16**(1): 2-4, 1992.

QUIROS, C.P.S.B.; BRUSH, D.S.; DOUCHES, K.; ZIMMERER, S.; HUESTIS,
 G. Biochemical and folk assessment of variability of Andean cultivated
 potatoes. **Economic Botany**, Bronx, **44**: 254-66, 1990.

RAMIREZ, H.; HUSSAIN, A.; ROCA, W.; BUSHUK, W. Isozyme
 electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of Cassava (*Manihot*
esculenta Crantz) varieties. **Euphytica**, Dordrecht, **36**(1): 39-48, 1987.

RENVOIZE, B.S. The area of origin of *Manihot esculenta* as a crop plant - a
 review of the evidence. **Economic Botany**, Bronx, **26**: 352-60, 1973.

ROGERS, D.J. Some botanical and ethnological considerations of *Manihot*
esculenta. **Economic Botany**, Bronx, **19**: 369-77, 1965.

ROGERS, D.J. & APPAN, S.G. **Manihot and manihotoides (Euphorbiaceae).**
Flora Neotropica, , 1973. 272p. (Monograph. n° 13).

ROGERS, D.J. Some further considerations on the origin of *Manihot esculenta*
 Crantz. **Tropical Root and Tuber Crops Newsletter**, **6**: 4-14, 1973.

ROGERS, D.J. & FLEMING, H.S. Monograph of *Manihot esculenta*. **Economic**
Botany, Bronx, **27**: 1-114, 1973.

ROLHF, F.J. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New
 York, Extern Publishing, 1988. 110 p.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in
 plants. **Biochemical Genetics**, New York, **3**: 37-79, 1969.

SILVA JARDIM, J.R. Hibridação interespecífica no gênero *Manihot* Adams.
 Viçosa, 1984. 74 p. (M.S. - Universidade Federal de Viçosa).

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels. **Biochemical Journal**,
 London, **61**: 629, 1955.

- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco, W.H. Freeman, 1973. 573 p.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, **73**(1): 9-26, 1983.
- STOREY, H.H. & NICHOLS, F.W. Studies of mosaic of cassava. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, **25**: 790-806, 1938.
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER, R.B. Biosys-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1,7, David L. Swofford, Illinois Natural History Survey All Rights Reserved, Illinois, 1989.
- UGENT, D.; POZORSKI, S.; POZORSKI, T. Archaeological manioc (*Manihot*) from Coastal Peru. **Economic Botany**, Bronx, **40**: 78-102, 1986.
- UMANAH, E.E. & HARTMANN, R.W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. **Journal American Society Horticultural Science**, St. Joseph, **98**(3): 272-4, 1973.
- VAUGHAN, D.A. & CHANG, T.T. In situ conservation of rice genetic resources. **Economic Botany**, Bronx, **46**: 368-83, 1992.

YAMADA, M.M. & GURIES, R.P. **A manual for starch gel electrophoresis
new chocolate lovers edition.** Staff Paper Series n°39. Department of
Forestry. University of Wisconsin - Madison, 22p. 1989.