VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA DE 200 ACESSOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

BETÂNIA LÚCIA ROCHA CABRAL

Engenheira Agrônoma

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

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 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 - Brasil
Março - 2001

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

Cabral, Betânia Lúcia Rocha
Variabilidade isoenzimática de 200 acessos de mandioca (*Manihot esculenta*
Crantz) / Betânia Lúcia Rocha Cabral. - - Piracicaba, 2001.
78 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Banco de gemoplasma 2. Eletroforese 3. Isoenzima vegetal 4. Mandioca 5.
Marcador genético 6. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDD 633.4

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

*"Só uma coisa torna o sonho impossível.
O medo de realizá-lo"
(Paulo Coelho)*

*A minha amada mãe Raimunda N. Rocha Cabral,
Ao meu pai Benedito R. Cabral
Aos meus irmãos queridos Tânia, Vânia, Jânia, Max, Silvânia e Marivaldo
As minhas sobrinhas Amanda, Yanne e Thaís
Aos meus cunhados Sanae e Tacileno
Ao meu querido Joelson Souza
Enfim a estas pessoas que eu amo tanto e estive tanto tempo longe.*

Dedico ...

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à Deus pela conclusão de mais uma etapa de minha formação.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro.
- A minha orientadora Dra. Elizabeth Ann Veasey pela amizade e apoio constante.
- Ao Dr. Akihiko Ando pela amizade e conhecimento transmitido.
- A Dra. Eloisa Maria Ramos Cardoso, pesquisadora da Embrapa - Amazônia Oriental pela valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.
- Aos professores do Departamento de Genética .
- Aos funcionários do Departamento de Genética-ESALQ/USP, pelo apoio para o desenvolvimento e condução de meu trabalho, em especial a: Amaral, Sr. Antônio, Ronaldo, Léia, Silvana de Oliveira, Adriana, Neusa, Macedônio, Oberdan, Cláudio Segatelli e José Monteiro.
- Ao pessoal do Serviço Social da ESALQ pela moradia concedida na Vila Estudantil.
- Aos meus queridos colegas da Vila Estudantil em especial a Cristina Lacerda, Ana Cláudia, Rosa Maria, Zilda de Fátima, Jeane, Sylvia Elaine, Geni, Norberto, Walter, Marcelino e Rafaelzinho, pessoas as quais tive a oportunidade de conviver e das quais nunca esquecerei.
- Aos colegas do curso de Pós-Graduação em especial a Ana Luiza, Ana Lúcia, Adelmo, Patrícia, Mariza, e Median pela amizade e companheirismo.
- Aos colegas do Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada: Rainério, Inez, Gilda e Edson, pela convivência e experiência transmitida.
- Aos amigos da colônia paraense em Piracicaba : Rainério e Rita Silva; Marcos André e Dênora Araújo; Michele Xavier; Cláudia Lira; Oriel, Rosinele e Michele Lemos, Rosângela Pena; Patrícia; e Antônio pelos momentos de saudosismo.

- Aos meus amigos do Lab. de Cultura de Tecidos da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará-FCAP, especialmente ao Prof. Dr. Milton Mota, as amigas Carmem Célia, Rosilene França, Maria do Socorro e Renata que me incentivaram a prosseguir.
- A minha família, pelo carinho, apoio e motivação.
- Ao Joelson pelo companheirismo, motivação, amizade e carinho.
- A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta, para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Taxonomia e caracterização botânica	3
2.2 Origem e distribuição	4
2.3 Estudos citogenéticos do gênero <i>Manihot</i>	6
2.4 Importância, consumo e produção	7
2.5 Bancos de germoplasma.	10
2.6 Aplicação de marcadores isoenzimáticos	11
2.7 Marcadores isoenzimáticos em mandioca	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Material	17
3.2 Métodos	24
3.2.1 Análise eletroforética	24
3.2.1.1 Coleta no campo	24
3.2.1.2 Extração de enzimas	25
3.2.1.3 Meio de suporte	27
3.2.1.4 Tampão eletrodo/gel	27
3.2.1.5 Corrida eletroforética	28
3.2.1.6 Revelação histoquímica	29
3.2.1.7 Documentação e interpretação dos géis	29

3.3 Análise estatística.....	32
3.3.1 Frequência alélica e genotípica.....	32
3.3.2 Índices de diversidade genética dos grupos de acessos	33
3.3.2.1 Heterozigosidade média observada	33
3.3.2.2 Heterozigosidade média esperada	34
3.3.2.3 Porcentagem de locos polimórficos	34
3.3.2.4 Número médio de alelos por locos	34
3.3.3 Análise da diversidade	36
3.3.4 Análise de agrupamentos	37
3.3.4.1 Coeficiente de similaridade	37
3.3.4.2 Método de agrupamento	38
3.3.5 Análise de acessos duplicados	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Eletroforese	39
4.2 Avaliação isoenzimática	40
4.3 Variabilidade genética	49
4.4 Distribuição da diversidade.....	55
4.5 Análise da similaridade entre os grupos de acessos.....	57
5 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Formas de utilização de produtos e subprodutos de mandioca, tanto da parte aérea como da raiz (EMBRAPA/CNPMF, 1993).....	8
2	Etapas da implantação do experimento com 200 acessos de mandioca: a) plantio em sacos plásticos no Departamento de Genética; b) plantio definitivo no campo; c) identificação dos acessos, com etiquetas de alumínio.....	18
3	Etapas do processo de extração das enzimas: a) coleta de folhas jovens tenras no campo; b) maceração do material com tampão; c) extrato obtido; d) "wicks" embebidos no extrato; e) armazenamento dos "wicks" em eppendorf.....	26
4	Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) com o loco A, alelos A1 e A2, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).....	45
5	Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Isocitrato desidrogenase (IDH) com o loco A, alelos A1 e A2, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).....	45
6	Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Fosfatase ácida (ACP) com o loco A, alelos A1 e A2, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).....	46
7	Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a Enzima málica (ME) com o loco A, alelos A1 e A2, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).....	46

8	Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Xiquimato desidrogenase (SKDH) com o loco A, alelos A1, A2, A3 e A4, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).....	47
9	Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Leucina Aminopeptidase (LAP) com os locos A e B, alelos A1, A2 e B, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).....	47
10	Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 11 acessos de mandioca para a enzima Malato desidrogenase (MDH) com os locos A e B, alelos A, B1, B2 e B3 , distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).....	48
11	Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Glutamato desidrogenase(GDH) com o loco A, alelos A1, A2 e A3, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).....	48
12	Dendrograma resultante da análise de agrupamento de cinco acessos de mandioca pertencentes ao grupo de Rondônia, utilizando-se coeficiente de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M.A.....	59
13	Dendrograma resultante da análise de agrupamento de sessenta e quatro acessos de mandioca pertencentes ao grupo do Pará, utilizando-se coeficientes de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M.A.....	59
14	Dendrograma resultante da análise de agrupamento de nove acessos de mandioca pertencentes ao grupo de diversos estados, utilizando-se coeficientes de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M.A.....	60
15	Dendrograma resultante da análise de agrupamento de quatro acessos de mandioca pertencentes ao grupo da Bahia,	

utilizando-se coeficientes de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M.A.....	60
16 Dendrograma resultante da análise de agrupamento de quatro acessos de mandioca pertencentes ao grupo do Amazonas, utilizando-se coeficientes de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M.A.....	61
17 Dendrograma resultante da análise de agrupamento de vinte e seis acessos de mandioca pertencentes ao grupo do Amapá, utilizando-se coeficientes de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M.A.....	61
18 Dendrograma resultante da análise de agrupamento de setenta e oito acessos de mandioca pertencentes ao grupo "Acessos sem origem", utilizando-se coeficientes de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M.A.....	62

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Relação dos acessos utilizados com código de identificação da coleção do Departamento de Genética, nome local, uso, origem do material e unidade federativa.....	19
2 Relação dos componentes do tampão de extração com seus respectivos volumes (Scandalios, 1969).....	25
3 Relação dos tampões do eletrodo e do gel, suas formulações e sistemas enzimáticos empregados.....	28
4 Duzentos acessos de mandioca divididos em sete grupos, com local de origem e códigos de identificação.....	35
5 Comparação entre duas populações hipotéticas (P e Q) com relação a possíveis combinações da presença e ausência de bandas.....	37
6 Frequências alélicas de cada loco isoenzimático para os grupos de acessos de mandioca.....	50
7 Frequências genotípicas para cada loco isoenzimático dentro dos grupos de acessos de mandioca	52
8 Variabilidade genética observada nos grupos de acessos de mandioca para os oito locos isoenzimáticos analisados.....	54
9 Estimativas da diversidade genética total (H_T), entre grupos (G_{ST}) e dentro de grupos (H_S) nos 200 acessos de mandioca avaliados.....	57

10	Comparação dos genótipos dos 200 acessos utilizados para detecção de indivíduos semelhantes para os oito locos avaliados com código de identificação, nome local e origem.....	65
----	--	----

VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA DE 200 ACESSOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

Autora: Betânia Lúcia Rocha Cabral

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie amplamente cultivada no Brasil, possuindo grande variabilidade para caracteres morfológicos, e elevada adaptação a climas e solos diferentes. A avaliação da variabilidade genética através da técnica de eletroforese de isoenzimas é bastante empregada em espécies vegetais.

Os acessos mantidos em bancos de germoplasma constituem um importante recurso genético para futuros trabalhos de melhoramento, porém é necessário conhecer-se as características peculiares de cada acesso. O estudo da variabilidade genética em bancos de germoplasma contribui para o conhecimento do genótipo de cada acesso, além de identificar materiais duplicados, o que reduz o custo com a manutenção do germoplasma. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de 200 acessos de mandioca através de oito sistemas isoenzimáticos [fosfatase ácida (ACP), leucina aminopeptidase (LAP), glucose-6-fosfato desidrogenase (G₆PDH), malato desidrogenase (MDH), xiquimato desidrogenase (SKDH), enzima málica (ME), glutamato desidrogenase (GDH) e isocitrato desidrogenase (IDH)] e verificar a existência de possíveis acessos duplicados.

Para a avaliação isoenzimática dos acessos de mandioca utilizou-se folhas tenras (recém-expandidas) e, como meio de suporte, gel de amido de milho a 12% de concentração.

Os acessos foram agrupados de acordo com o local de origem, obtendo-se desta forma sete grupos: 1-Amazonas, 2-Amapá, 3-Bahia, 4-Pará, 5-Rondônia, 6-Diversos, incluindo-se neste grupo os acessos que apresentavam-se em pequena quantidade por local de origem (um ou no máximo dois indivíduos), e 7- Acessos sem origem, incluindo-se neste grupo os acessos que não apresentavam local de origem definida.

Cada sistema apresentou um loco polimórfico. O número médio de alelos por loco variou de 2,3 a 2,5. A heterozigosidade média observada variou de 0,381 a 0,615 e a esperada de 0,479 a 0,559. A variabilidade genética dentro dos grupos foi maior que a variabilidade entre os grupos para todos os oito locos analisados, com valores médios entre grupos (G_{ST}) de 0,049 e dentro de grupos (H_S) de 0,482.

Através da análise de similaridade genética, utilizando-se o índice de Jaccard, foi confeccionado um dendrograma para cada grupo de acessos, observando-se grande variabilidade genética entre os acessos avaliados. Os dendrogramas foram comparados a uma planilha contendo os 200 acessos agrupados de acordo com a semelhança de seus genótipos para os oito locos avaliados, com a finalidade de verificar a existência de possíveis acessos duplicados. Os dendrogramas mostraram a presença de 11 pares de acessos repetidos. Destes, somente três pares de acessos apresentaram similaridade para os oito locos analisados, os quais podem ser considerados como possíveis materiais duplicados.

ISOZYMIC VARIABILITY OF 200 ACCESSIONS OF CASSAVA

(*Manihot esculenta* Crantz)

Author: Betânia Lúcia Rocha Cabral

Adviser: Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey

SUMMARY

The Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a widely cultivated species in Brazil, possessing great variability for morphologic characters, and high adaptation to climates and different soils. The evaluation of the genetic variability through the technique of isozyme electrophoresis is widely used in plant species.

The accessions maintained in germplasm banks constitute an important genetic resource for future plant breeding programs. However, it is necessary to know the peculiar characteristics of each accession. The study of the genetic variability in germplasm banks contributes to the knowledge of the genotype of each accession, besides identifying duplicated materials, which reduces the cost with the maintenance of the germplasm. The objective of the present work was to evaluate the genetic variability of 200 cassava accessions using eight isozymic systems [acid phosphatase (ACP), leucine aminopeptidase (LAP), glucose-6-phosphate deshydrogenase (G₆PDH), malate dehydrogenase (MDH), shikimate dehydrogenase (SKDH), malic enzyme (ME), glutamate dehydrogenase (GDH) and isocitrate dehydrogenase (IDH)] and to verify the existence of possible duplicated accessions.

For the isozymic evaluation of the cassava accessions tender recently-expanded leaves were used as well as, as a support medium, starch gel at 12% of concentration.

The accessions were grouped according to their origin, into seven groups: 1-Amazonas, 2-Amapá, 3-Bahia, 4-Pará, 5-Rondônia, 6-Diversos, including in this group the accessions with a maximum of two individuals per place of origin, and 7 - Accessions of unknown origin, including in this group the accessions without a defined origin.

Each system presented a polymorphic locus. The mean number of alleles per locus varied from 2.3 to 2.5. The mean observed heterozygosity varied from 0.381 to 0.615 and the mean expected heterozygosity from 0.479 to 0.559. The genetic variability within groups was greater than the variability among groups for all of the eight loci analyzed, with mean values among groups (G_{ST}) of 0.049 and within groups (H_S) of 0.482.

Through the genetic similarity analysis, using the Jaccard index, a dendrogram was made for each group of accessions, where a high genetic variability was observed among accessions. The dendrograms were compared with a sheet containing the 200 accessions grouped according to the similarities of their genotypes for the eight analysed loci, with the purpose of verifying the existence of possible duplicated accessions. The results showed the presence of 11 pairs of repeated accessions. Of these, only three pairs of accessions presented similarity for the eight analyzed loci, which can be considered as possible duplicated materials.

1 INTRODUÇÃO

A mandioca é uma das mais importantes fontes de calorias, considerada um dos componentes essenciais da dieta da população de baixa renda em algumas regiões tropicais, chegando a fornecer 50% das calorias necessárias à dieta alimentar diária (Campos, 1987). Devido a essa capacidade extraordinária, a cultura da mandioca representa a esperança da produção de alimentos ricos em carboidratos e energia para a população de baixa renda. É utilizada de forma integral: as raízes são empregadas na alimentação humana e animal e na indústria; as hastes e as folhas servem, principalmente, como fonte de proteína na alimentação animal.

A perda da diversidade pela rápida degradação de ecossistemas seja por queimadas, avanço das fronteiras agrícolas, construção de hidroelétricas ou mesmo pelo lançamento de cultivares mais produtivas, substituindo as variedades locais, nos mostra a necessidade de conservação desse material. Principalmente por que a mandioca é uma espécie cultivada não sendo encontrada espontaneamente na natureza.

Os bancos de germoplasma têm como objetivo principal prevenir a erosão genética das espécies dando suporte aos programas de melhoramento. Possuem como função básica coletar, conservar, caracterizar, e identificar acessos duplicados, documentar e promover o intercâmbio desses acessos entre as instituições de ensino e pesquisa (Fukuda, 1999). Porém, nem sempre as instituições que mantêm bancos de germoplasma têm o suporte necessário para a avaliação e caracterização de suas coleções.

A avaliação da variabilidade genética através da eletroforese de isoenzimas é muito empregada para acessos de bancos de germoplasma, devido ao seu baixo custo com relação a outros marcadores e por proporcionar uma boa caracterização dos indivíduos. Desta forma, o uso da técnica de eletroforese em acessos de mandioca proporcionará importantes informações sobre a variabilidade dos genótipos, abrindo novas perspectivas para futuros programas de melhoramento das cultivares já existentes além de identificar possíveis materiais duplicados, reduzindo custos com a manutenção destes no campo.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a variabilidade genética de 200 acessos de mandioca por meio de marcadores isoenzimáticos, e identificar através de locos polimórficos possíveis acessos duplicados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia e caracterização botânica

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), dentro da sistemática botânica de classificação hierárquica, pertence à classe das Dicotiledôneas, subclasse Archiclamydeae, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, tribo Manihoteae, gênero *Manihot*.

Roger & Appan (1973) afirmam existir 98 espécies já identificadas, dentre as quais a mandioca é a única cultivada para fins comerciais. Pereira & Carvalho (1979) e Rogers (1963) sugerem a existência de cerca de 180 espécies. Para Conceição (1987), o gênero *Manihot* apresenta cerca de 200 espécies.

Apresenta flores femininas e masculinas na mesma inflorescência, sendo que as flores femininas são unissexuadas por aborto e a polinização é feita principalmente por abelhas e vespas. As flores femininas amadurecem alguns dias antes das flores masculinas (dicogamia protogínica), e admite-se, por consequência, que a mandioca pertence ao grupo das plantas alógamas. Silva (2000) observou taxas de cruzamento de até 91,5% entre etnovariedades, confirmando como alogamia o sistema reprodutivo da mandioca.

Seu porte varia entre um a cinco metros, e apresenta sistema caulinar sub-arbustivo erecto, podendo ser predominantemente indiviso no ciclo vegetativo e posteriormente ramificado no ciclo reprodutivo. Quando adulto o caule é lenhoso, dotado de nós salientes, e apresenta coloração bem variada (verde, cinza a avermelhada). Suas folhas são do tipo simples palmipartidas,

alternas com lobos que variam quanto ao formato, cor, tamanho e em número que pode ser de 5 a 9. Os pecíolos são compridos (10-20cm), delgados, e de cor variando do verde ao roxo. A coloração do broto terminal é considerada como uma característica botânica importante das cultivares, podendo ser roxo, verde, cobreado e vermelho (Conceição, 1987).

O fruto é uma cápsula com uma a três sementes (tricoca) (Silva, 2000), de deiscência loculícida e septícida, que se abre por seis valvas quando completamente maduro (seco). A abertura se dá quando as cápsulas ainda se acham presas à planta, podendo também ocorrer no solo. Há cultivares que apresentam frutos providos de asas bem desenvolvidas e sinuosas e outras sem essas formações. As sementes são carunculadas, apresentando testa e tegmen, micrópila, hilo, rafe e chalaza. O embrião é central, com folhas cotiledonárias grandes, maiores que a radícula. O endosperma é abundante e oleaginoso (Conceição, 1987).

Em plantas oriundas de sementes, as raízes apresentam tipo axial tuberoso, ocorrendo algumas vezes a formação de raízes secundárias feculentas. Em plantas propagadas agamicamente (maniva), ocorre o modelo pseudo-fasciculado tuberoso que é o principal produto de consumo. As raízes são ricas em fécula, apresentando-se sob várias conformações: cilíndricas, cilíndrico-cônicas, cônicas, fusiformes e, algumas vezes, globosas (Conceição, 1987). O rendimento de raízes (número e tamanho) por planta varia conforme a cultivar, ambiente de cultivo e os tratamentos culturais utilizados.

2.2 Origem e distribuição

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie originária da América do Sul, mas seu centro de origem ainda é discutido. Entretanto, evidências apontam a Amazônia como sendo o mais provável. Ribeiro Filho (1976) cita que De Candolle constatou que a maioria das espécies silvestres do gênero *Manihot* encontra-se em estado espontâneo no Brasil. Segundo Schmidt

(1951), o gênero foi disseminado do Norte até as Antilhas, América Central, pela parte sul da América do Norte e por todo o território brasileiro. Vavilov, citado por Montaldo (1979), considera que, além da mandioca, as plantas cultivadas tais como amendoim (*Arachis hypogaea*), borracha (*Hevea brasiliensis*), mate (*Ilex paraguayensis*) e abacaxi (*Ananas comosa*) são pertencentes ao centro de origem Brasil-Paraguai.

Com relação à origem genética ou botânica, Albuquerque & Cardoso (1980) afirmam que o seu ancestral mais antigo seja *Manihot pusila* Pohl, porém a ocorrência desta espécie em estado nativo na parte central do Brasil (Estados de Goiás e Bahia) não implica, necessariamente, que seja esta a sua área de origem geológica ou geográfica, pois podem ter havido outras áreas de ocorrência em épocas anteriores. Álem (1994), através de caracteres morfológicos e características geográficas, constatou que a espécie *M. flabellifolia* é o ancestral da mandioca. Olsen & Schaal (1999), utilizando marcadores moleculares, também concordam que *M. flabellifolia* é o ancestral da mandioca.

Estudos arqueológicos feitos por Renvoize (1973), Rouse & Cruxent (1963) e Reichel-Dolmatoff (1957; 1965), citados por Hershey & Amaya (1989), comprovam que quando os portugueses aqui chegaram, os índios já cultivavam a mandioca, tendo fortes evidências que os povos primitivos que habitavam a América do Sul e Central até o México já conheciam a espécie e utilizavam suas raízes na alimentação. Do Brasil, houve uma rápida dispersão da cultura da mandioca para vários países e continentes. No final do século XVI, os portugueses introduziram a mandioca no Continente Africano. Os conquistadores e comerciantes espanhóis a levaram para a Costa Ocidental da Mesoamérica, Sudeste Asiático e Oceânia. 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). Hoje sabe-se que o cultivo da mandioca ocorre por toda a região tropical do globo.

2.3 Estudos citogenéticos do gênero *Manihot*

Quanto ao estudo citogenético da mandioca, o primeiro trabalho foi realizado por Graner (1935), que observou que, em 37 variedades, 36 apresentavam cromossomos de tamanho entre 1 a 2μ de comprimento por $0,3\mu$ de largura, e um total de 18 cromossomos duplos na metáfase da primeira divisão meiótica. A grande maioria dos autores que estudaram o cariótipo das espécies do gênero *Manihot*, também encontraram 18 cromossomos bivalentes na metáfase I e um desenvolvimento meiótico normal nas demais fases (Conceição, 1987).

Estudos sobre o cariótipo do gênero *Manihot* mostraram que, de 98 espécies descritas, apenas para 20 foi determinado o número de cromossomos como sendo $2n=36$, não apresentando diferenças significativas de comprimento dos cromossomos entre as espécies. Seus cromossomos são considerados pequenos, com forma de bastonetes e metacêntricos. O número básico de cromossomos para o gênero, sugerido por Perry (1943), é de $x = 9$. Umanah & Hartmann (1973) chegaram à mesma conclusão quando estudaram as espécies *M.esculenta* e *M.glaziovii*. Os autores as definiram como alopoliplóides, com cariótipos bastante similares, diferindo apenas no segundo par de cromossomos satélites, que apresentaram comprimento médio diferente, sendo $3,1\mu$ em *M.glaziovii* e $2,2\mu$ em *M.esculenta*. A similaridade de cariótipos é considerada uma desvantagem para estudos citogenéticos e filogenéticos. Entretanto, é uma vantagem para o melhoramento por possibilitar a transferência genética através de cruzamentos interespecíficos.

O estudo da microsporogênese em algumas cultivares revelou irregularidade e diversos graus de esterilidade. O nucléolo tem um comportamento irregular durante a meiose, apresentando-se muitas vezes sob a forma de pequenos nucléolos, alguns dos quais frequentemente se perdem no citoplasma na ocasião da formação da membrana celular (Montaldo, 1979).

Com o objetivo de descobrir as causas da esterilidade em híbridos interespecíficos e de restauração da fertilidade dos mesmos, Carvalho (1995) realizou estudos citogenéticos em híbridos obtidos na primeira e segunda geração de cruzamento entre *M. pseudoglaziovii* e *M. esculenta*. As prováveis causas da esterilidade observada, na primeira geração, foram a formação de univalentes, atraso de cromossomos na anáfase I e formação de tétrades com micronúcleos. Neste caso, a restauração da fertilidade pode ser obtida através da utilização de pólen não-reduzido ($2n$). Na segunda geração, foi verificada a ocorrência de aneuploides (por exemplo, $2n=38$), o que ocasiona a formação de gametas não-balanceados, resultantes de trissomia.

2.4 Importância, consumo e produção

A raiz é a parte mais importante da mandioca e é aproveitada de diversas formas tanto na alimentação humana como na alimentação animal e, principalmente, na indústria (Figura 1).

Baseado na raiz, as variedades podem ser divididas em duas classes: mandioca de mesa, também conhecida como mansa ou macaxeira, que é consumida “in natura”; mandioca amarga também conhecida como mandioca brava, ou, propriamente dita, mandioca, que é utilizada nas indústrias para a produção de álcool e principalmente de farinha. Esta divisão baseia-se no teor de ácido cianídrico (HCN): as mandiocas mansas possuem baixos teores de ácido cianídrico enquanto que as amargas apresentam altos teores. No entanto, esta divisão é contestada por muitos autores, uma vez que o teor do referido ácido é resultante da interação de diversos fatores como a deficiência de potássio, estresse hídrico, fertilidade do solo e outros fatores ambientais (Normanha, 1956; Rogers & Fleming, 1973).

Figura 1. Formas de utilização de produtos e subprodutos de mandioca, tanto da parte aérea como da raiz (EMBRAPA/CNPMF, 1993).

No Brasil, o maior consumo da mandioca se dá nas regiões Norte e Nordeste. Na região Nordeste, o consumo médio em kg/ano/habitante foi calculado em cerca de 73,8 kg de farinha de mesa pelas populações rurais e de 32 kg pelas urbanas (Conceição, 1987). O cultivo é feito sem uso de insumos ou qualquer tecnologia avançada, algumas vezes em consórcio com outras culturas, sendo claramente observada grande variabilidade fenotípica dentro e entre as roças dos agricultores. Nestas regiões, a mandioca é plantada principalmente por pequenos agricultores que, através de técnicas artesanais, preparam a farinha que é utilizada para o consumo e comercialização do excedente em feiras e mercados. Toda farinha produzida é destinada ao abastecimento da região, e o processo de preparo, bem como o tamanho dos "grânulos", e o ponto de torragem da farinha consumida diferem nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Além da farinha, ocorre grande diversidade de produtos alimentícios obtidos a partir da mandioca. Albuquerque & Cardoso (1980) citam 32 pratos típicos diferentes, além de bebidas produzidas na região Norte.

Vários estudos (D'utra, 1899; Zehntner, 1919; Bangham, 1950; Normanha, 1962; Conceição et al., 1973), citados por Conceição (1987), demonstram a superioridade nutritiva do farelo e feno de folhas e hastes de mandioca na alimentação bovina, quando comparada a outras culturas como o farelo de cana-de-açúcar.)

O Brasil é o segundo maior produtor mundial (20,17 milhões de toneladas, em 1999) perdendo apenas para a Nigéria (32,69 milhões de toneladas, em 1999). O Norte e Nordeste do Brasil são as áreas onde concentram-se a maioria das lavouras de mandioca, porém o maior rendimento médio por hectare é obtido no Estado de São Paulo, nas regiões de Assis, Mogimirim e Ourinhos (São Paulo, 1999).)

A produção mundial vem crescendo nos últimos três anos, assim como o aumento da área plantada, porém o rendimento médio não tem crescido nas mesmas proporções. Há, portanto, necessidade de se produzir mais com

melhor qualidade para abastecer o mercado mundial, suprimindo a demanda. Deste modo, o melhoramento genético de cultivares pode contribuir para um maior rendimento, aumento da resistência a patógenos, produtividade e qualidade dos produtos obtidos.)

O conhecimento da variabilidade contida em roças de agricultores que preservam suas variedades locais conhecidas como "etnovariedades" (Silva, 2000), que são passadas de pai para filho, e de acessos contidos em bancos de germoplasma, amplia a possibilidade de obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a pragas ou patógenos.

2.5 Bancos de germoplasma

A mandioca apresenta grande variabilidade genética, isto porque a propagação vegetativa através de estacas (manivas) favorece o aparecimento e a fixação de numerosas cultivares nas regiões tropicais (Leitão Filho, 1971). Estes novos genótipos têm grande potencialidade para serem aproveitados no melhoramento genético da cultura. Neste contexto, a coleta, preservação e caracterização de germoplasma previnem a erosão genética dos cultivos e asseguram a variabilidade genética imprescindível aos programas de melhoramento. Em mandioca, a erosão ocorre principalmente em decorrência da expansão das fronteiras agrícolas, lançamento de novas cultivares, desmatamento, e dos estresses bióticos e abióticos.

O germoplasma de mandioca no Brasil tem sido pouco explorado sob o ponto de vista genético, devido principalmente à falta de estudos preliminares a respeito da potencialidade dos genótipos. Caracterizações e documentações adequadas permitem a utilização mais racional de germoplasma nos programas de melhoramento e facilitam o intercâmbio do material e de informações (Fukuda et al., 1996).

O aumento da produtividade, da resistência a patógenos e tolerância a pragas, são as características mais importantes na cultura da

mandioca, portanto constituem em principais objetivos dos programas de melhoramento genético da mandioca. Várias instituições como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em São Paulo, a Embrapa Mandioca e Fruticultura (EMBRAPA-CNPMPF) na Bahia, e o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) na Colômbia, têm desenvolvido pesquisas empregando-se técnicas modernas, objetivando desenvolver cultivares melhoradas de mandioca.

Van Sloten (1987) aponta três principais causas responsáveis pela limitação do uso de germoplasmas contidos nos bancos que são:

- Os melhoristas gostam de trabalhar com materiais avançados, vindos de programas de melhoramento e não com raças locais, cultivares antigas ou espécies silvestres mantidas nos bancos;
- A maioria dos melhoristas possuem suas coleções de trabalho;
- As informações existentes sobre os materiais (acessos) dos bancos de germoplasma são inadequadas ou insuficientes para os melhoristas.

Costa & Morales (1994) fizeram um levantamento das coleções de mandioca no Brasil e catalogaram 4300 acessos, e verificaram através de dados de passaporte que 30% desses acessos são duplicações.

2.6 Aplicação de marcadores isoenzimáticos

Marcadores moleculares e isoenzimáticos constituem ferramentas de grande importância para a identificação e caracterização dos acessos mantidos pelos Bancos de Germoplasma de mandioca espalhados por todo o mundo (CIAT na Colômbia; International Institute of tropical Agriculture (IITA) na Nigéria; Institut Français de Recherche Scientifique pour le Developpementen Coopération (ORSTOM) na Costa do Marfim; CNPMPF, EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), IAC no Brasil, etc.), auxiliando de maneira bastante eficiente os pesquisadores que desejam utilizá-los nos programas de melhoramento. Estas técnicas facilitam o trabalho dos

melhoristas, pois permitem identificar, com maior rapidez, o melhor acesso a ser estudado ou utilizado nas recombinações genéticas, além de evitar a existência de duplicações de acessos nos bancos, diminuindo assim os custos com a manutenção.

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 microrganismos, análise filogenética, e principalmente, na identificação e caracterização de materiais que fazem parte de coleções dos bancos de germoplasma (Alfenas, 1998).

A nitidez e a eficiência da eletroforese de isoenzimas dependem fundamentalmente da composição do meio e dos tampões através dos quais as moléculas devem passar. A técnica é bastante simples e aplicável a qualquer tipo de planta, revelando grande número de locos e alelos (Paiva, 1992). Embora em número limitado, vários locos isoenzimáticos podem ser analisados rápido e simultaneamente. Por exemplo, o sistema de detecção em eletroforese em gel longitudinal pode ser feito em até seis fatias, o que permite analisar um ou mais locos em cada uma delas. Por isso hoje, mesmo com o desenvolvimento de técnicas moleculares mais modernas como RFLP, RAPD e microsátélites, por exemplo, as isoenzimas continuam sendo uma classe de marcadores muito útil para análises genéticas em estudos que não requeiram uma amostragem ampla do genoma.

Como os alelos isoenzimáticos são co-dominantes, genótipos heterozigotos e homozigotos de um determinado loco podem ser identificados. Esta técnica permite a estimativa direta de parâmetros genéticos, tais como frequências genotípicas, frequências alélicas e, a partir destes, coeficientes de diversidade gênica e heterozigosidade (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Estes parâmetros são de grande valia tanto na coleta e preservação de germoplasma como no melhoramento de plantas.

2.7 Marcadores isoenzimáticos em mandioca

A aplicação de marcadores isoenzimáticos tem sido feita com diversas finalidades no gênero *Manihot*. Brondani (1996a) realizou estudos isoenzimáticos para estimar o grau de similaridade genética entre *M. esculenta* e as três espécies *M. flabellifolia*, *M. peruviana* e *M. pilosa*, sendo que estas espécies assemelham-se morfológicamente. Foram utilizados 17 sistemas isoenzimáticos: Xiquimato desidrogenase (SKDH), Leucina aminopeptidase (LAP), Hexocinase (HK), Superóxido dismutase (SOD), Fosfatase ácida (ACP), Fosfatase alcalina (ALP), 6-fosfogluconato desidrogenase (PGD), Fosfoglucose isomerase (PGI), Aldolase (ALD), Isocitrato desidrogenase (IDH), Malato desidrogenase (MDH), Fosfoglucomutase (PGM), Fosfatase alcalina (AK), Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADHHDH), Glucose desidrogenase (GDH) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato desidrogenase (NADPHDH). Os dados obtidos indicaram que *M. flabellifolia*, *M. peruviana* e *M. esculenta* formam um grupo bastante relacionado, enquanto que *M. pilosa* não formou grupo com nenhuma espécie. A conclusão do autor foi de que as espécies *M. flabellifolia* e *M. peruviana* podem ser utilizadas para o melhoramento através de cruzamentos convencionais com *M. esculenta*. O estabelecimento de relações filogenéticas mais apuradas entre estas três espécies pode determinar qual foi o genoma precursor, e a partir de qual momento ocorreu a especiação, e qual foi a espécie que deu origem às outras duas, onde pode-se empregar marcadores isoenzimáticos.

A partir de extratos de folhas e pólen, Lefèvre & Charrier (1993a) avaliaram o polimorfismo isoenzimático de 365 cultivares de mandioca e 109 acessos silvestres (*M. glaziovii* e híbridos interespecíficos espontâneos), utilizando dez enzimas (ACP, Leucina aminopeptidase (AMP), Esterase (EST), GOT, IDH, MDH, PGD, PGI, PGM e Sorbitol desidrogenase (SDH) em gel de amido. A herança enzimática foi analisada através de 13 progênies intra e

interespecíficas. Os autores basearam-se em 17 locos polimórficos com 59 alelos. Foram identificados três grupos de ligação e todos os padrões enzimáticos mostraram herança dissômica.

Através de tecidos de raiz e folhas, Borsoi Filho (1995) avaliou o nível de polimorfismo enzimático em seis cultivares de mandioca (Moça-branca, Murundum, Aipim-Quintal, Alecrim, Sela-Égua e Chagas) sob condições normais e em regime de estresse hídrico e ataque por ácaros (*Monony chellus tanajoa*), através de sete sistemas enzimáticos [EST, ACP, GOT, GDH, LAP, MDH e Peroxidase (PO)] utilizando gel de amido de milho. O autor concluiu que os sistemas isoenzimáticos são estáveis, sendo que os sistemas ACP e MDH, mesmo sob condições de estresse, permaneceram estáveis.

Epperson et al. (1997) fizeram uma avaliação dos custos de manutenção das coleções de germoplasma de mandioca "in vitro" e do campo do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e constataram que os gastos eram na mesma proporção tanto para a coleção no campo como para a coleção mantida "in vitro", e que a utilização da análise isoenzimática reduz a possibilidade de incorporar materiais que chegam ao CIAT com nomes locais, porém sendo acessos já existente nas coleções. Neste contexto, a utilização da análise isoenzimática poderá reduzir gastos extra com possíveis acessos duplicados no Instituto, diminuindo assim custos com a manutenção, pois trata-se de uma análise menos dispendiosa com bons resultados.

Brondani (1996b) analisou dois possíveis híbridos naturais de espécies do gênero *Manihot*. O primeiro provável híbrido natural seria resultante do cruzamento entre *Manihot nana* e *M. nogueirae* que foi analisado através de nove sistemas [SKDH, Glucose-6-fosfato desidrogenase (G₆PDH), NADH₂DH, GOT, ACP, SOD, LAP, AK e NADPH₂DH]. O segundo híbrido seria resultante da hibridação entre *M. hilariana* e *M. salicifolia*, analisado através de cinco sistemas [IDH, MDH, PGI, PGD e Menadiona redutase (MR)]. Utilizando o índice de similaridade genética de Jaccard, constatou que entre os indivíduos analisados não havia nenhum híbrido natural entre *M. nana* e *M. nogueirae*, mas que

provavelmente há ocorrência de um híbrido entre *M. hilariana* e *M. salicifolia*. Estas novas recombinações de alelos podem proporcionar a fixação de novas espécies do gênero *Manihot*.

Faraldo (1999) analisou através de onze sistemas isoenzimáticos [Citosol aminopeptidase (CAP), ACP, PGM, PGI, Enzima málica (ME), G₆PDH, Aspartato aminotransferase (AAT), IDH, MDH, Manitol desidrogenase (MADH) e SKDH] com 15 locos polimórficos, 141 etnovariedades de sete locais diferentes (Rio Negro, Rio Branco, Mato Grosso, Rio Solimões, São Paulo, Pará e Xingu) utilizando amostras de folhas recém-espandidas em gel de amido (na concentração de 12%). Foi observado número médio de alelos por loco de 2,1, heterozigosidade média observada e esperada de 0,345 e 0,415, respectivamente, com valor médio da estimativa do coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) de 0,088. Os resultados obtidos mostraram que existe maior variabilidade genética dentro de roças do que entre roças, concordantes com o padrão observado para plantas alógamas.

Sambatti (1998), avaliando a diversidade genética em quatro roças de mandioca no município de Ubatuba-SP, através de quatro sistemas enzimáticos (LAP, MDH, SKDH e PGI) em gel de amido (penetrose 30 a 13%) e doze caracteres morfológicos, constatou também maior diversidade genética dentro das roças que entre as roças.

Peroni (1998) avaliou a variabilidade intra-específica em roças de mandioca manejadas por agricultores tradicionais autóctones do sul do litoral paulista e do Vale do Ribera de Iguape, através de onze marcadores isoenzimáticos, em gel de amido [Alfa esterase (α -EST), Catalase (CAT), PGM, PGI, EM, GDH, AAT, LAP, MDH, MADH e SKDH] e 21 caracteres morfológicos para 356 indivíduos. O coeficiente de similaridade genética revelou valores de 1,0 (clones) a 0,692 entre genótipos, sendo 97,6% o valor máximo de semelhança encontrado entre genótipos diferentes.

Utilizando gel de poliacrilamida em gradiente, Silva (2000) avaliou o fluxo gênico e o sistema reprodutivo de 56 etnovariedades de mandioca de

diferentes regiões geográficas, através de oito sistemas isoenzimáticos [CAP, Glucose-6-fosfato isomerase (GPI), SKDH, G₆PDH, AAT, GTDH, ACP e Catalase (CAT)] com dez locos polimórficos, obtendo 91,5 % de taxa de cruzamento, confirmando ser a mandioca uma espécie alógama. O fluxo gênico mostrou ser efetivo, via grão de pólen, entre as etnovariedades de regiões geográficas diferentes.

Hussain et al. (1987) desenvolveram a metodologia para a determinação de padrões isoenzimáticos de esterase em gel de poliacrilamida para mandioca a partir de extratos de raízes, de treze cultivares de diferentes genótipos conhecidos, que apresentaram claramente diferentes padrões isoenzimáticos, os quais foram utilizados para comparação com cultivares a serem identificadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram analisados duzentos acessos obtidos junto à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental, localizada em Belém do Pará, do Banco Ativo de Germoplasma. Estes acessos foram trazidos para Piracicaba na forma de estacas com aproximadamente um metro de comprimento parafinadas nas extremidades para evitar a desidratação do material. Ao chegarem em Piracicaba as estacas foram divididas em estacas menores de aproximadamente 20 cm de comprimento possuindo no mínimo quatro gemas por estaca, plantadas em sacos plásticos de três litros contendo terra preta e latossolo amarelo na proporção de 1:1; foram preparadas três repetições de cada acesso mantidos ao ar livre. Após cinco meses, o material foi finalmente transplantado para o campo, sendo que duas repetições de cada acesso foram plantadas em espaçamento 2,0 x 2,0m na Estação Experimental de Anhembi localizada a aproximadamente 60 km de Piracicaba, pertencente à ESALQ-USP e administrada pelo Departamento de Genética. Uma repetição foi plantada em espaçamento 1,0 x 0,8m em área do Departamento de Genética, ESALQ-USP, em Piracicaba, SP (Figura 2).

A Tabela 1 mostra a relação dos acessos trazidos da EMBRAPA - Amazônia Oriental. Decorridos seis meses do plantio definitivo foram iniciadas as etapas de extração das enzimas para as análises de eletroforese de isoenzimas.

Figura 2. Etapas da implantação do experimento com 200 acessos de mandioca: a) plantio em sacos plásticos no Departamento de Genética; b) plantio definitivo no campo; c) identificação dos acessos, com etiquetas de alumínio.

Tabela 1. Relação dos acessos utilizados com código de identificação da coleção do Departamento de Genética, nome local, uso, origem do material e unidade federativa.

CÓDIGO	NOME LOCAL	USO	LOCAL DE ORIGEM	UF
DG 200	Maranhense 2	Farinha	Belém	PA
DG 201	EAB - 675	Farinha	Tracuateua	PA
DG 202	Pretinha SDC	Farinha	São Domingos do capim	PA
DG 203	SRT 1105 (Mico)	Mesa	EMPASC ¹	SC
DG 204	Maragogibe	Mesa	CNPMF ²	—
DG 205	Caranaçu 1	Farinha	AC	AC
DG 206	Caranaçu 2	Farinha	AC	AC
DG 207	Man. Raimundo José	Farinha	Pedra Branca	AP
DG 208	Olho Roxo	Farinha	— ³	—
DG 209	Mandioca 645 (EAB645)	Farinha	EAB ⁴	—
DG 210	Casca roxa	Mesa	Santarém	PA
DG 211	Iracema	Farinha	Bragança	PA
DG 212	Duquinha	Farinha	Alenquer	PA
DG 213	Jurará	Farinha	—	—
DG 214	BGM 019 (Xingu)	Farinha	Belém	PA
DG 216	Amarela 1	Mesa	Bragança	PA
DG 217	Açaí	Mesa	Portel	PA
DG 218	Orenina	Farinha	Calama	RO
DG 219	Soi Preto	Farinha	Pedra Branca	AP
DG 220	Lo urukavá	Farinha	—	—
DG 221	Tucun	Farinha	Bragança	PA
DG 222	EAB 1156	Farinha	PA	PA
DG 223	Rouei	Farinha	Porto Grande	AP
DG 224	Uapixuna	Farinha	Alto Rio Negro	AM
DG 225	Saracura	Mesa	Ferreira Gomes	AP
DG 226	Amarela amariaçu	Farinha	Baixo Amazonas	PA
DG 227	EAB 688	Farinha	Santarém	PA
DG 228	Osso duro	Farinha	Lagoa Seca	PB
DG 229	Inajazão	Farinha	—	—
DG 230	Agami	Farinha	Oiapoque	AP
DG 231	Sutinga (ração animal)	Farinha	Bragança	PA
DG 232	BGM 116 (Cigana Preta)	Farinha	—	—
DG 233	Palikura pequena	Farinha	—	AP
DG 234	Tumase	Farinha	Oiapoque	AP
DG 235	Amareloná	Farinha	Tracuateua	PA
DG 236	549	Farinha	Híbrido CPATU ⁵	PA

(Continua)

Tabela 1. (Continuação)

CÓDIGO	NOME LOCAL	USO	LOCAL DE ORIGEM	UF
DG 237	Preta 2	Mesa	Ferreira Gomes	AP
DG 238	Sem Nome	Farinha	—	—
DG 239	Imitação	Farinha	Pesqueira	PE
DG 240	Engana ladrão	Farinha	Santarém	PA
DG 241	Mandiocaba	Farinha	—	—
DG 242	Jacaré	Farinha	—	—
DG 243	Camarão 2	Farinha	Santarém	PA
DG 244	Acari	Farinha	—	—
DG 245	Aipim rosa	Mesa	Portel	PA
DG 246	Chapéu de sol	Farinha	Viseu	PA
DG 247	Tapioqueira	Farinha	Belém	PA
DG 248	Cearense 2	Farinha	CNPMF	—
DG 249	EAB 1121	Farinha	Baixo Amazonas	AM
DG 250	Louis Petit	Farinha	Vizeu	PA
DG 251	Olho Verde	Farinha	Santarém	PA
DG 252	Feifim	Farinha	Santana do Araguaia	PA
DG 253	Preta 1	Mesa	Pedra Branca	AP
DG 254	Itaúba	Farinha	Oiapoque	AP
DG 255	EAB 1108	Farinha	CNPMF	—
DG 256	Guanamara	Farinha	São Domingos do Capim	PA
DG 257	Preta esgalhada	Farinha	Porto Grande	AP
DG 258	Gurijuba	Farinha	Castro Alves	BA
DG 259	38 Fio de Ouro	Farinha	CNPMF	—
DG 260	Milagrosa 2	Farinha	Alenquer	PA
DG 261	0020 Iracema	Farinha	CNPMF	—
DG 262	Nanivin	Farinha	—	—
DG 263	Bahia	Mesa	Bragança	PA
DG 264	Ibaisik	Farinha	AM	AM
DG 265	Amarela 1	Farinha	Santarém	PA
DG 266	8816-012	Farinha	—	—
DG 267	EAB 676	Farinha	Santarém	PA
DG 268	3 Meses	Mesa	—	—
DG 270	Cultivar precoce	Farinha	São Domingos do Capim	PA
DG 271	588	Farinha	—	—
DG 272	Mantiqueira 0211	Farinha	—	—
DG 273	Clone 4919	Farinha	Escola Agrotec. Castanhal	—
DG 274	Orana	Farinha	Machadinha do Oeste	RO
DG 275	Pretona ereta	Farinha	Pedra Branca	AP
DG 276	Manteiga	Mesa	Pedra Branca	AP

(Continua)

Tabela 1. (Continuação)

CÓDIGO	NOME LOCAL	USO	LOCAL DE ORIGEM	UF
DG 277	EAB 942	Farinha	Santarém	PA
DG 278	EAB 630	Farinha	—	—
DG 279	Sem Nome 1	Mesa	Porto Grande	AP
DG 280	Olho verde 2	Farinha	PA	PA
DG 281	Ereta	Mesa	Santarém	PA
DG 282	CPM 0703	Farinha	Bragança	PA
DG 283	Branca Ouro	Farinha	—	—
DG 284	Vermelhão	Farinha	RO	RO
DG 285	Amarelinha	Farinha	Oiapoque	AP
DG 286	Cachimbo	Farinha	Uaupés-Ilha das Flores	AM
DG 287	Saracura 2	Farinha	Pedra Branca	AP
DG 288	Água Morna	Mesa	—	—
DG 289	116 (Cidade Rica)	Farinha	CNPMF	—
DG 290	Olho verde-BGM1469	Farinha	Bragança	PA
DG 291	Lesa	Farinha	Santarém	PA
DG 292	Mirim	Farinha	Tracuateua	PA
DG 293	Flor de Boi	Farinha	CNPMF	—
DG 294	IM 280	Farinha	Belém	PA
DG 295	Milagrosa RG	Farinha	Santarém	PA
DG 296	CPM 0501	Farinha	UFBA ⁶	—
DG 297	Siolina	Farinha	Ferreira Gomes	AP
DG 298	Abacate	Farinha	Santo Amaro	BA
DG 299	IAC - Mantiqueira	Farinha	IAC ⁷	—
DG 300	Altamira	Mesa	Ilha do Marajó	PA
DG 301	Pau de xexéu 2	Farinha	—	PE
DG 302	Cearense bacuri	Farinha	CNPMF	—
DG 303	Tataruaia	Farinha	Altamira	PA
DG 304	Sem Nome 2	Mesa	—	—
DG 305	Wick	Farinha	Tabatinga	AM
DG 306	Pirarucu	Farinha	Ferreira Gomes	AP
DG 307	Clone 8911	Farinha	—	—
DG 308	121 59M-mex	Farinha	—	—
DG 309	EAB 708	Farinha	Cametá	PA
DG 310	Apinagé	Farinha	Alto Rio Negro	AM
DG 311	EAB 1195	Farinha	Mazagão	AP
DG 312	Bragança	Mesa	Santo Amaro	BA
DG 313	Javarite	Farinha	AM	AM
DG 314	Gavião	Farinha	UFBA	—
DG 315	Xingu	Farinha	Bragança	PA

(Continua)

Tabela 1. (Continuação)

CÓDIGO	NOME LOCAL	USO	LOCAL DE ORIGEM	UF
DG 315	Xingu	Farinha	Bragança	PA
DG 317	IAC - 52230	Farinha	Campinas-IAC	—
DG 318	Inajá	Farinha	—	—
DG 319	Branquinha	Farinha	CNPMF	—
DG 316	CPM - 1425	Farinha	CNPMF	—
DG 320	Maranhense 1	Farinha	—	—
DG 321	CPM - 004	Farinha	CNPMF	—
DG 322	Arrozina	Farinha	Rodônia	RO
DG 323	Boião	Farinha	Bragança	PA
DG 325	Amarela 2	Farinha	Cametá	PA
DG 326	Olho roxo de Altamira	Farinha	Altamira	PA
DG 327	Witadehemesik	Farinha	—	—
DG 328	Ouricuri	Farinha	—	—
DG 329	SRT-1310 (Pioneira)	Mesa	IAC	—
DG 330	IAC - 2870	Farinha	Campinas-IAC	—
DG 331	Vizeu	Farinha	Tabatinga	AM
DG 332	Jamamadi 2	Farinha	—	—
DG 333	Pão Manaus	Mesa	CPAA ⁸	—
DG 334	Macaxeirão	Mesa	Bragança	PA
DG 335	CPATU - 133	Farinha	Santarém	PA
DG 336	Medicilândia	Farinha	—	—
DG 337	BGM - 062	Farinha	—	—
DG 338	IAC - 576/70	Farinha	Campinas-IAC	—
DG 339	Biotechnology 1	Farinha	—	—
DG 340	Jaboti	Farinha	—	—
DG 341	Hamburguesa	Farinha	Cruz das Almas	BA
DG 342	Belterra	Farinha	Belém	PA
DG 343	CPM 2424	Farinha	UFBA	—
DG 344	Galibi	Farinha	Castanhal	PA
DG 345	Vovô	Farinha	Tabatinga	AM
DG 346	Inambu roxa	Farinha	Oiapoque	AP
DG 347	Maniçobeira	Farinha	—	—
DG 348	Sem Nome	Farinha	—	—
DG 349	Jaburu	Farinha	—	—
DG 350	Castanha	Farinha	CPAF ⁹	—
DG 351	Macaxeira 25	Mesa	—	—
DG 352	EAB - 645	Farinha	Santarém	PA
DG 353	Brasileirinha (Biotec.)	Farinha	—	—
DG 354	Amarela	Farinha	—	—

(Continua)

Tabela 1. (Continuação)

CÓDIGO	NOME LOCAL	USO	LOCAL DE ORIGEM	UF
DG 355	Saracura (BA)	Mesa	CNPMF	—
DG 356	Calzavara	Mesa	—	PE
DG 358	Itapuaia	Farinha	São Domingos do Capim	PA
DG 359	Boi	Farinha	AM	AM
DG 360	0080- Engana Ladrão	Farinha	—	—
DG 357	Pau de xexeú 1-BGM0905	Farinha	—	—
DG 361	Pingo de Ouro	Farinha	Altamira	PA
DG 362	BGM -087	Farinha	—	—
DG 363	Bata Uaça	Farinha	Alto Rio Negro	AM
DG 364	EAB - 687	Farinha	Lagoa Seca	PB
DG 365	IM - 341	Farinha	—	—
DG 366	IM - 230	Farinha	Oiapoque	AP
DG 367	CPM - 276	Farinha	São Domingos do Capim	PA
DG 368	Amarela tóxica	Farinha	Macapá	AP
DG 369	Mameluca	Farinha	—	—
DG 370	Pecuí	Farinha	Porto Grande	AP
DG 371	Jararaca 1	Farinha	—	—
DG 372	Peruana	Mesa	Porto Grande	AP
DG 373	Bato Kamomie Noie	Farinha	Lábrea	AM
DG 374	Cearense	Farinha	São Domingos do Capim	PA
DG 375	F 5077	Farinha	Santarém	PA
DG 376	Nova Timboteua	Farinha	—	—
DG 377	CPM - 2438	Farinha	CNPMF	—
DG 378	Ouricuri	Farinha	—	—
DG 379	Aipim Quintal	Mesa	—	—
DG 380	Cinzenta	Farinha	—	—
DG 381	Pingo de Ouro 2	Farinha	MA	MA
DG 382	BGM - 037	Farinha	—	—
DG 383	Klaisnasik	Farinha	AM	AM
DG 384	Pretinha	Farinha	Ferreira Gomes	AP
DG 385	IM - 186	Farinha	—	—
DG 386	Amarela	Mesa	—	—
DG 387	EAB - 668	Farinha	Bragança	PA
DG 388	Boa Fama	Mesa	Machadinha do Oeste	RO
DG 389	CPM - 111	Farinha	UFBA	—
DG 390	Milton 2	Farinha	Vizeu	PA
DG 391	Santarém	Farinha	Pedra Branca	AP
DG 392	Olho Preto	Mesa	—	—
DG 393	EAB - 425	Fari nha	Santarém	PA

(Continua)

Tabela 1. (Continuação)

CÓDIGO	NOME LOCAL	USO	LOCAL DE ORIGEM	UF
DG 394	EAB - 591	Farinha	Cametá	PA
DG 395	Jamamadi 1	Farinha	Altamira	PA
DG 396	Panela	Farinha	Tabatinga	AM
DG 398	Pacajás	Farinha	—	—
DG 399	Cacau amarela	Mesa	Bragança	PA
DG 400	Tumasea	Farinha	Curralinho	PA
DG 401	Branquinha	Mesa	CNPMF	—
DG 402	Tareza	Farinha	Nova Timboteua	—

¹ EMPASC - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina; ² Embrapa Mandioca e Fruticultura; ³ Acessos sem origem definida; ⁴ Escola de Agronomia da Bahia; ⁵ Embrapa Amazônia Oriental; ⁶ Universidade Federal da Bahia; ⁷ Instituto Agrônomo de Campinas; ⁸ Embrapa Amazônia Ocidental; ⁹ Embrapa Arroz e Feijão.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise eletroforética

Foram testados 12 sistemas enzimáticos: PGI, PGM, ME, IDH, MDH, ACP, G₆PDH, LAP, SKDH, GDH e GOT. Destes, foram selecionados oito, que permitiram uma melhor leitura das bandas e apresentaram-se polimórficos:

- Malato Desidrogenase (MDH)
- Leucina Aminopectidase (LAP)
- Xiquimato Desidrogenase (SKDH)
- Glucose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH)
- Glutamato Desidrogenase (GDH)
- Fosfatase Ácida (ACP)
- Isocitrato Desidrogenase (IDH)
- Enzima Málica (ME)

3.2.1.1 Coleta no campo

Deu-se prioridade para a coleta do material plantado no próprio Departamento de Genética (Figura 2), por estar mais próximo do Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada (LEEGA), onde foram feitas as análises. Assim, somente era feita coleta na estação do Anhembi quando o material

plantado no Departamento havia morrido ou apresentava-se atacado por pragas ou doenças. Foram coletadas amostras de folhas jovens tenras de cada acesso no campo, pela manhã, armazenadas em pequenos recipientes plásticos com a identificação na tampa do código do acesso, e armazenadas em caixas térmicas de isopor com gelo, procedimento esse adotado para evitar modificações bioquímicas nas enzimas a serem analisadas. No LEEGA, o material era imediatamente macerado para extração das enzimas.

3.2.1.2 Extração de enzimas

Foram utilizadas aproximadamente 0,2 g de cada amostra coletada com quatro gotas de solução tampão para extração baseada na fórmula de Scandalios (1969) (Tabela 2). As amostras foram maceradas em placas de acrílico resfriada, com o auxílio de um bastão de vidro e mantidas sobre barra de gelo durante o processo de extração (Figura 3). Após a homogeneização, cada amostra foi absorvida em "wicks" (tiras de papel filtro - Whatman nº3) com dimensões de 4x13 mm. Os "wicks" embebidos no extrato, quando não eram usados imediatamente após a extração, eram colocados em "eppendorfs" identificados e armazenados em "ultra-freezer" (-80°C) para corridas posteriores.

Tabela 2. Relação dos componentes do tampão de extração com seus respectivos volumes (Scandalios, 1969).

Produto	Quantidade
- Tampão Tris (0,1 M) pH 7,5	200mL
- Sacarose (0,2M)	6,892g
- P.V.P. (Polivinil-Pirrolidona)	1,20g
- E.D.T.A. (1Mm)	0,672g
- Albumina bovina	0,20g

Figura 3. Etapas do processo de extração das enzimas: a) coleta de folhas jovens tenras no campo; b) maceração do material com tampão; c) extrato obtido; d) "wicks" embebidos no extrato; e) armazenamento dos "wicks" em eppendorf de 0,5 mL.

3.2.1.3 Meio de Suporte

O meio de suporte utilizado foi o gel de amido preparado a partir de amido de milho comercial. Foram testadas a penetrose-30 e a penetrose-50. Por apresentar-se mais translúcida, dando melhor resolução às bandas, optou-se pela penetrose-50 na concentração de 13%. Para a confecção do gel, foram utilizados 250mL de solução tampão para o gel (Tabela 3) e 32,5 g de penetrose, aquecidos em forno de microondas, com agitação, por aproximadamente 2 minutos. Quando iniciava a fervura, o forno era desligado e a solução vertida em forma feita com bastões de acrílico e fundo de vidro nas dimensões 16,2 x 20,0 cm. Após esfriarem, os géis eram envolvidos em filme de PVC para evitar ressecamento e armazenados em refrigerador por até dois dias.

3.2.1.4 Tampão eletrodo/gel

Três sistemas de tampão eletrodo/gel foram testados: Tris Citrato-TC (Soltis et al., 1983), Citrato Morfolina-CM (Clayton & Tretiak, 1972) e o sistema AB (Wendel & Weeden, 1990). A partir das análises preliminares, procurou-se os sistemas com boa resolução das combinações entre tampões de eletrodo/gel, selecionando-se os sistemas TC e CM para os sistemas enzimáticos, relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação dos tampões do eletrodo e do gel, suas formulações e sistemas enzimáticos empregados.

TAMPÃO DO ELETRODO	TAMPÃO DO GEL	SISTEMA ENZIMÁTICO
Citrato Morfolina (CM) - pH = 6,1 Ácido cítrico (0,04M) - 8,41g/L Ajustar o pH com N-(3-Aminopropyl) Morfolina (0,068M) Completar para 1000mL	5% do tampão do eletrodo diluído em 1000mL de água destilada	LAP
		SKDH GDH G ₆ PDH
Tris Citrato (TC) - pH = 7,5 Tris (0,223M) - 27g/L Ácido Cítrico (0,086M) - 18,07g/L Ajustar o pH com NaOH	3,5% do tampão do eletrodo diluído em 1000mL de água destilada	MDH
		ME IDH ACP

3.2.1.5 Corrida eletroforética

Os géis eram cortados com bisturi cirúrgico a 2,5 cm de uma das extremidades. Na fenda do gel eram aplicados com pinça verticalmente os "wicks", um de cada amostra, e nas extremidades do gel eram adicionados "wicks" embebidos em solução de azul de bromofenol (com 0,04g para 100 mL de água) com a finalidade de marcar a linha de frente durante a migração. O gel contendo as amostras era colocado em cubas de acrílico com 250 mL de solução tampão do eletrodo nas laterais. Durante a migração, os géis eram mantidos em balcão frigorífico à temperatura ao redor de 4°C. As cubas com eletrodos eram ligadas à fonte de energia a corrente constante de 20 mA durante os primeiros 30 minutos; após este tempo, eram retirados os "wicks" e a corrente passada para 40 mA. A voltagem variava conforme o tampão do

eletrodo/gel utilizado, ficando em média 100volts para o sistema TC e 190 volts para o sistema CM. O tempo de corrida era de oito horas, quando o marcador de bromofenol atingia aproximadamente 7 cm de migração.

Após a corrida, os géis eram cortados em cinco fatias de aproximadamente 2,0 mm de espessura, com auxílio de guias laterais e uso de fio de nylon (0,15 mm). A primeira e a quinta fatias eram eliminadas aproveitando-se apenas a segunda, terceira e quarta fatias.

3.2.1.6 Revelação histoquímica

Para a revelação, as fatias eram vertidas em formas refratárias do tipo "pirex" com solução específica de cada sistema enzimático, em seguida colocadas em estufa à temperatura de 37° C, no escuro, pelo período de 20 a 40 minutos, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Após a revelação, as soluções eram descartadas e os géis lavados em água corrente.

3.2.1.7 Documentação e interpretação dos géis

Após a lavagem em água corrente cada gel era fotografado e transparentizado sob transluminador em folhas plásticas, com auxílio de caneta de retroprojeter, transcrevendo a posição exata das bandas.

A relação dos sistemas enzimáticos empregados com suas respectivas formulações, encontra-se abaixo descrita:

- Leucina Aminopeptidase (LAP- E.C. 3.4.11.1) (Soltis et al., 1983)

"Fast Garnet GBC"	25 mg
Tampão Tris-maleato (0,2M), pH 5,2	50 mL
L-leucina- β -naftilamida em 1%	0,02 g

- Malato Desidrogenase (MDH - E.C. 1.1.1.37). (Shaw & Prasad, 1970, modificado).

NAD ⁺	15 mg
NBT	15 mg
PMS	1 mg
Na-L-Malato (0,1 M), pH 7,0	5 mL
NaCN (0,1M)	2,5 mL
Tampão HCl (0,5 M), pH 7,1	7,5 mL
Água destilada	35 mL

- Xiquimato Desidrogenase (SKDH- E.C. 1.1.1.25) (Soltis et al., 1983)

Ácido Xiquímico	50 mg
MTT	10 mg
NADP ⁺	10 mg
PMS	1 mg
Tampão Tris HCl (0,1 M), pH8,5	50 mL

- Glutamato Desidrogenase (GDH – E.C.1.4.1.3). (Soltis, 1983, modificado)

NBT	10 mg
NAD ⁺	10 mg
PMS	1 mg
Tampão Tris HCl (0,1 M), pH 8,0	50 mL
Ácido L-glutâmico	50 mg

- Enzima Málica (ME – E.C.1.1.1.40) (Harris & Hopkinson, 1978; Soltis et al., 1983)

DL-ác. málico (2,0M), pH 8,0	7 mL
NADP ⁺	10 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg
MgCl ₂ (1%)	1 mL
Tampão Tris HCl (0,1 M), pH 8,0	50 mL

- Glucose-6-fosfato Desidrogenase (G₆PDH – E.C.1.1.1.49) (Soltis et al., 1983, modificado).

D-glucose-6-fosfato	10 mg
NADP ⁺	10 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg
MgCl ₂ (1%)	0,5 mL
Tampão Tris HCl (0,2 M), pH 8,0	50 mL

- Fosfatase Ácida (ACP- E.C.3.1.3.2). (Cheliak & Pitel, 1984)

α -naftil fosfato ác. de sódio	0,05 g
Fast garnet GBS salt	0,05 g
MgCl ₂ (1%)	0,50 mL
Tampão Acetato de sódio (0,1 M), pH 5,0	50 mL

- Isocitrato Desidrogenase (IDH – E.C.1.1.1.42). (Brewer & Sing, 1970)

DL-ác. isocitríco, Na ₃	0,10 g
------------------------------------	--------

NADP+, Na ₂	10 mg
MTT	10 mg
PMS	1 mg
MgCl ₂ (1%)	1 mL
Tampão Tris HCl (0,1 M), pH 8,0	50 mL

3.3 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita através da interpretação dos zimogramas obtidos do genótipo de cada acesso, possibilitando a estimativa dos vários parâmetros de variabilidade genética dos grupos de acessos. Para a análise, os acessos foram agrupados de acordo com suas origens, ou seja, nome do estado (unidade federativa) de origem. Os estados que apresentaram menos de quatro acessos foram reunidos num só grupo, denominado "Diversos", assim como os acessos sem dados de origem foram também reunidos para formar outro grupo denominado "Acessos sem origem". Sete grupos foram avaliados, como mostra a Tabela 4.

3.3.1 Frequências alélicas e genotípicas

A frequência alélica descreve a variação para um loco (Torggler et al., 1995), e é obtida pela contagem de vezes em que cada alelo é encontrado, dividindo-se pelo número total de alelos no loco. Assim:

$$\hat{p}_{ij} = \frac{n_{ij}}{n_j}$$

em que:

$\hat{p}_{ij}$ = frequência do alelo i no grupo j;

n_{ij} = número de ocorrência do alelo i no grupo j ;

n_j = número total de alelos amostrados no grupo j ;

A frequência genotípica refere-se à variação de um grupo gênico e pode ser obtida da transformação direta da frequência fenotípica, no caso em que se conhece a relação entre os genótipos específicos e os fenótipos correspondentes; é calculada pelo número de vezes que cada genótipo é observado, dividido pelo número total genótipos (Ayala & Kiger, 1984).

3.3.2 Índices de diversidade genética dos grupos de acessos

Com as frequências alélicas obteve-se os índices de diversidade genética para cada acesso, como heterozigosidade média observada ($\hat{H}_o$), heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$), número médio de alelos por loco (A), porcentagem de locos polimórficos (P) e índice de fixação de Wright ($\hat{f}$). Esses índices são estimativas obtidas a partir do programa BIOSYS-1, desenvolvido por Swofford & Selander (1989), estimados pelo programa da seguinte forma:

3.3.2.1 Heterozigosidade média observada ($\hat{H}_o$)

A heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$) para cada loco foi obtida da seguinte forma:

$$\hat{H}_o = 1 - \sum \hat{p}_{ii} \quad (\text{Nei, 1978})$$

Em que:

$\hat{p}_{ii}$ = frequência dos genótipos homozigóticos;

Para a obtenção da heterozigosidade média observada somou-se os valores obtidos para cada loco, dividido pelo número total de locos (polimórficos).

3.3.2.2 Heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$)

A heterozigosidade para cada loco foi obtida através das frequências alélicas, segundo expectativas de equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com Nei (1978):

$$\hat{H}_e = 2n(1 - \sum \hat{p}_i^2)/(2n - 1)$$

Em que:

$\hat{p}_i$ = frequência alélica estimada do i ésimo alelo;

n = número de indivíduos amostrado

Através da média aritmética entre todos os locos analisados (polimórficos), foi obtida a heterozigosidade média esperada.

3.3.2.3 Porcentagem de locos polimórficos (P)

A porcentagem de locos polimórficos foi obtida dividindo-se o número de locos polimórficos pelo número total de locos. Considerou-se como um loco polimórfico, aquele em que a frequência do alelo mais comum não ultrapassa 95% de probabilidade.

3.3.2.4 Número médio de alelos por loco (A)

O número médio de alelos por loco foi obtido pela média aritmética do número total de alelos dividido pelo número total de locos.

Tabela 4. Duzentos acessos de mandioca divididos em sete grupos, com local de origem e códigos de identificação.

Grupo	Local de Origem (nº de acessos)	Códigos dos acessos
Amazonas	Amazonas (14)	DG 224; DG 249; DG 264; DG 286; DG 305; DG 310; DG 313; DG 331; DG 345; DG 359; DG 363; DG 373; DG 383; DG 396
Amapá	Amapá (26)	DG 207; DG 219; DG 223; DG 225; DG 230; DG 233; DG 234; DG 237; DG 253; DG 254; DG 257; DG 275; DG 276; DG 279; DG 285; DG 287; DG 297; DG 306; DG 311; DG 346; DG 366; DG 368; DG 370; DG 372; DG 384; DG 391
Bahia	Bahia (4)	DG 258; DG 298; DG 312; DG 341
Diversos	Maranhão, Paraíba, Acre Pernambuco, Santa Catarina (9)	DG 381; DG 228; DG 364; DG 239; DG 301; DG 356; DG 205; DG 206; DG 203
Pará	Pará (64)	DG 200; DG 201; DG 202; DG 210; DG 211; DG 212; DG 214; DG 216; DG 217; DG 221; DG 222; DG 226; DG 227; DG 231; DG 235; DG 236; DG 240; DG 243; DG 245; DG 246; DG 247; DG 250; DG 251; DG 252; DG 256; DG 260; DG 263; DG 265; DG 267; DG 270; DG 277; DG 280; DG 281; DG 282; DG 290; DG 291; DG 292; DG 294; DG 295; DG 300; DG 303; DG 309; DG 315; DG 323; DG 325; DG 326; DG 334; DG 335; DG 342; DG 344; DG 352; DG 358; DG 361; DG 367; DG 374; DG 375; DG 387; DG 390; DG 393; DG 394 DG 395; DG 397; DG 399; DG 400
Rondônia	Rondônia (5)	DG 218; DG 274; DG 284; DG 322; DG 388
Acessos sem origem	Acessos sem local de origem (78)	DG 204; DG 208; DG 209; DG 213; DG 220; DG 229; DG 232; DG 238; DG 241; DG 242; DG 244; DG 248; DG 255; DG 259; DG 261; DG 262; DG 266; DG 268; DG 271; DG 272; DG 273; DG 278; DG 283; DG 288; DG 289; DG 293; DG 296; DG 299; DG 302; DG 304; DG 307; DG 308; DG 314; DG 316; DG 317; DG 318; DG 319; DG 320; DG 321; DG 327; DG 328; DG 329; DG 330; DG 332; DG 333; DG 336; DG 337; DG 338; DG 339; DG 340; DG 343; DG 347; DG 348; DG 349; DG 350; DG 351; DG 353; DG 354; DG 355; DG 357; DG 360; DG 362; DG 365; DG 369; DG 371; DG 376; DG 377; DG 378; DG 379; DG 380; DG 382; DG 385; DG 386; DG 389; DG 392; DG 398; DG 401; DG 402

3.3.3 Análise da diversidade

A análise da diversidade em populações subdividas, conforme Nei (1973), se fundamenta na distribuição da heterozigosidade ou diversidade genética total (H_T), entre (D_{ST}) e dentro (H_S) de subpopulações. Neste trabalho, cada grupo de acessos foi considerado uma subpopulação. Utilizou-se o programa DISPAN (Genetic Distance and Phylogenetic Analysis) (Kumar et al, 1993) para esta análise.

Os estimadores para H_T , D_{ST} e H_S são descritos em Nei (1987), como:

$$\hat{H}_S = 2n(1 - \sum_K x_K^2) / (2n - 1)$$

$$\hat{H}_T = 1 - \sum_i x_i^2 + \hat{H}_S / (2ns)$$

Onde:

n = número de indivíduos amostrados

x = frequência do alelo k na população

s = número de grupos

x_i = média ponderada da frequência do alelo k nos grupos

$\sum_i x_i^2$ = média do somatório da frequência alélica quadrada entre os grupos

Sendo:

$$\hat{H}_T = \hat{H}_S - \hat{D}_{ST}$$

A proporção da diversidade genética atribuída ao componente entre populações (grupos), é estimada por $\hat{G}_{ST}$, como:

$$\hat{G}_{ST} = \hat{D}_{ST} / \hat{H}_T$$

3.3.4 Análise de agrupamento

3.3.4.1 Coeficiente de similaridade

A expectativa de um coeficiente de similaridade é representar a relação linear entre dois itens avaliados por um conjunto comum de p variáveis. A maioria dos coeficientes são obtidos a partir de cálculos de variáveis binárias representando presença e ausência com valores de 1 a 0, respectivamente. Portanto, a comparação de dois itens quaisquer (populações, cultivares, clones, indivíduos, etc.) possibilita a construção de uma tabela 2 x 2 com formato de contingência, utilizando-se das frequências de bandas observadas no zimograma (Alfenas, 1998). Na Tabela 5, de contingência, exemplifica quatro possíveis combinações dos tipos concordância e discordância:

Tabela 5. Comparação entre duas populações hipotéticas (P e Q) com relação a possíveis combinações da presença e ausência de bandas.

		População P		Total
		Presença (1)	Ausência (0)	
População Q	Presença (1)	a	b	a + b
	Ausência (0)	c	d	c + d
Total		a + c	b + d	n

$n = a + b + c + d$; a= presença da banda em ambas as populações (número de contagens de concordância do tipo 1 1); b= presença da banda na população Q e ausência em P (número de contagens de discordâncias do tipo 1 0); c= ausência da banda em Q e presença em P (número de contagens de discordâncias do tipo 0 1); d= ausência da banda em ambas as populações (número de contagens de concordâncias do tipo 0 0).

A similaridade genética entre os acessos foi estimada pelo coeficiente proposto por Jaccard (S_j) (Jain & Singh, 1979) a partir do algoritmo da equação a seguir. O coeficiente de Jaccard presta-se melhor para comparar populações dentro da mesma espécie, em que concordâncias são mais freqüentes (Alfenas, 1998).

$$S_j = \frac{a}{a+b+c}$$

a - presença da banda em ambas as populações (grupos)

b - presença da banda na população(grupos) Q e ausência em P

c - ausência da banda em Q e presença em P

3.3.4.2 Método de agrupamento

O método Hierárquico Aglomerativo de medida das distâncias, obtido a partir das matrizes de distância, utiliza pares de medidas não ponderadas, também denominado de "Unweighted pair group method with arithmetic average" (U.P.G.M.A.) (Cruz & Regazzi, 1994).

Para os cálculos e confecção dos dendrogramas utilizou-se o programa FITOPAC versão 1.0, desenvolvido por George J. Shepherd da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo.

3.3.5 Análise de acessos duplicados

Através dos fenótipos de cada acesso foi feita uma comparação entre estes, com o objetivo de saber quais eram semelhantes ou idênticos, para todos os oito sistemas isoenzimáticos. Para tanto, o programa Excel versão 97 foi utilizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eletroforese

Os padrões de bandas observados por sistemas isoenzimáticos podem ser vistos nas Figuras 4 a 11, através de fotografias dos locos analisados, zimogramas com a identificação dos acessos, distância percorrida pelas bandas e o marcador (em centímetros) e os fenótipos atribuídos. Os sistemas selecionados foram os que apresentaram melhor resolução para os tampões utilizados (TC e CM). Para cada sistema estudado considerou-se apenas um loco polimórfico em boas condições de análise.

O extrato obtido de folhas jovens tenras como já mencionado em muitos trabalhos foi o que possibilitou melhor resolução (Kephart, 1990; Lefèvre & Charrier, 1993a; Borsoi Filho, 1995; Faraldo, 1999; e Silva, 2000), além de não causar a eliminação dos indivíduos após a avaliação.

A utilização de materiais recém coletados no campo é a mais adequada para análise. Porém, nem sempre pode-se trabalhar com materiais frescos, quando por exemplo, tem-se um grande número de indivíduos para analisar em um determinado estágio de desenvolvimento e não se dispõem deste material nas estações de outono e inverno, período em que não há emissão de folhas novas. Neste caso, o armazenamento é essencial.

Não foram observadas diferenças entre folhas tenras de mandioca coletadas no mesmo dia da corrida eletroforética e folhas armazenadas em ultrafreezer a aproximadamente -80°C por 16 dias para sistemas com enzimas mais sensíveis a perda de atividade e por até 36 dias para sistemas menos

sensíveis. Os extratos de folhas armazenados em ultrafreezer não mostraram diferentes padrões de bandas com relação ao material recém-coletado e avaliado no mesmo dia.

Kephart (1990) menciona que dependendo do tecido e espécie utilizada, o armazenamento do material coletado pode causar diminuição ou perda da atividade enzimática. Em *Silene*, houve uma queda da atividade enzimática após a primeira semana do armazenamento, porém para muitos sistemas enzimáticos esta atividade se prolongou por até um mês.

Reis (1996), analisando a variabilidade genética em populações naturais de palmiteros (*Euterpe edulis* Martius), utilizou folíolos de plântulas recém coletados e armazenados por até 3 semanas sem alterar os sistemas enzimáticos utilizados. Lacerda (1997), trabalhando com *aroeira* (*Myracrodruon urundeuva* Freire & Allemão), coletou folhas de indivíduos adultos, macerou com tampão de extração e armazenou em ultrafreezer (-80°C) por vários meses.

Dos oito sistemas enzimáticos utilizados, foram analisados apenas locos polimórficos, apesar de terem sido observados locos monomórficos em alguns sistemas, os quais não foram avaliados. Como o objetivo deste trabalho foi a avaliação da variabilidade genética e a identificação de possíveis materiais duplicados, os locos monomórficos pouco contribuiriam para a análise dos acessos, uma vez que estes locos apresentaram o mesmo padrão de bandas para todos os indivíduos.

4.2 Avaliação isoenzimática

- Glucose-6-fosfato desidrogenase (G₆PDH)

Este sistema enzimático apresentou um loco (A) com dois alelos (A₁ e A₂), considerando-se uma enzima monomérica apresentando duas bandas nos indivíduos heterozigotos (Figura 4). Dentre os sistemas analisados, o G₆PDH foi o de mais difícil interpretação. As bandas não separam-se com

nitidez nos indivíduos heterozigotos, houve também uma variação na altura e intensidade das bandas para um mesmo loco, porém é visível o polimorfismo do loco. Faraldo (1999) observou etnovariedades de mandioca com dois locos isoenzimáticos, G_6pdh-1 monomérico e G_6pdh-2 dimérico. Silva (2000) observou um loco gênico, dimérico, porém com um dos acessos apresentando quatro alelos; os demais acessos apresentaram uma banda para os indivíduos homozigotos e três bandas para os indivíduos heterozigotos.

- Isocitrato desidrogenase (IDH)

A análise da enzima IDH mostrou atividade monomérica, apresentando um loco ($Idh-1$) com duas bandas para os acessos heterozigotos e para os acessos homozigotos uma banda apenas (Figura 5). Estes mesmos resultados foram observados por Faraldo (1999) e diferem dos resultados observados por Lefèvre & Charrier (1993a) que interpretou dois locos, um dimérico e outro monomórfico.

- Fosfate ácida (ACP)

A enzima fosfatase ácida apresentou um loco apenas com dois alelos (A_1 e A_2) comportando-se como uma enzima monomérica. Não foram observados indivíduos heterozigotos, como demonstrado na Figura 6. Pela literatura, pode-se observar a enzima fosfatase ácida, em plantas, como dimérica ou monomérica. Os resultados obtidos diferem dos observados por Borsoi Filho (1995) e Faraldo (1999), os quais observaram dois locos monoméricos, e Lefèvre & Charrier (1993a), que observaram também dois locos, um monomórfico e outro polimórfico dimérico. Os resultados apresentados por Silva (2000) são os que mais se aproximam dos apresentados nesse trabalho, que verificou um loco monomérico com os indivíduos heterozigotos apresentando duas bandas.

- Enzima málica (ME)

Este sistema enzimático caracterizou-se por apresentar um loco (Me-1) polimórfico, monomérico com acessos heterozigotos apresentando duas bandas (Figura 7). Faraldo (1999) observou dois locos monoméricos. A literatura menciona ser a enzima málica de estrutura tetramérica com um loco para a maioria dos vegetais.

- Xiquimato desidrogenase (SKDH)

O sistema enzimático xiquimato desidrogenase apresentou um único loco isoenzimático (Skdh-1) monomérico com quatro alelos (Figura 8), sendo que os indivíduos heterozigotos apresentaram duas bandas. Na revisão feita por Kephart (1990) sobre eletroforese de isoenzimas em gel de amido de plantas, o sistema SKDH apresenta-se monomérico com um a dois locos, estando localizado no citosol e nos plastídios.

Estes mesmos resultados foram encontrados por Lefèvre & Charrier (1993a), Faraldo (1999), Silva (2000) e Peroni (1998). Este último autor também encontrou quatro bandas, mas fez uma separação em dois grupos, A e B, devido a inconstância da banda de número 4 quanto à sua resolução em alguns indivíduos, que o autor acreditou ser devido a idade diferenciada das plantas analisadas; isto porque os indivíduos cuja banda número 4 estava presente tinham 7 meses de idade a mais que os outros indivíduos que não apresentavam esta banda.

Neste trabalho não foi evidenciada nenhuma relação da quarta banda quanto à idade dos acessos analisados, até mesmo porque indivíduos com a mesma idade de plantio foram analisados.

- Leucil Aminopeptidase (LAP)

A enzima LAP é considerada de estrutura monomérica pela literatura, sendo localizada no citosol atuando no catabolismo de proteínas. Neste trabalho foi verificada a presença de um loco monomérico (Lap-1) com o

heterozigoto apresentando duas bandas (Figura 9). Um segundo loco (Lap-2) mostrou ser de herança do tipo dominante presente somente em 34 indivíduos (17%). O terceiro loco, que seria o loco Lap-3, não foi analisado por não apresentar-se nítido. O segundo loco (Lap-2) representado pelo alelo B, foi observado também em outros trabalhos (Peroni, 1998; Faraldo, 1999 e Silva, 2000). Silva (2000) analisando uma progênie de etnovarietades cujo parente masculino apresentava o alelo B, observou que 55,56% da progênie apresentava o alelo B, constatando ser este alelo de um gene nuclear, não sendo de herança citoplasmática, pois se o fosse a planta-mãe o transmitiria a todos os seus descendentes.

O sistema LAP também foi avaliado em mandioca por Borsoi Filho (1995), utilizando folhas e raízes, obtendo o mesmo padrão para ambos os materiais avaliados, sendo observada a presença de duas bandas monomórficas nos seis cultivares avaliados. O autor provavelmente não observou polimorfismo por ter avaliado apenas seis cultivares. As duas bandas encontradas por ele foram, provavelmente, do loco A (A_1 e A_2), um loco monomérico cujo heterozigoto apresenta duas bandas.

Lefèvre & Charrier (1993a), avaliando a herança genética de 17 locos isoenzimáticos de *M. esculenta*, encontraram um loco com um a três alelos, considerando o loco B como fazendo parte do loco A.

- Malato desidrogenase (MDH)

O sistema malato desidrogenase apresentou dois locos (A e B). O loco A não foi analisado por apresentar-se monomórfico, analisando-se somente o loco B (Figura 10). Este apresentou-se polimórfico com duas bandas por indivíduo, com três locos (B_1 , B_2 e B_3).

Os resultados observados assemelham-se aos observados por Faraldo (1999), que detectou uma região com dois locos monomórficos, e uma terceira região polimórfica dimérica com três bandas para os indivíduos heterozigotos, que não foram observados neste trabalho. Lefèvre & Charrier

(1993a) apresentaram para este sistema de 3 a 8 bandas com três níveis de migração e três locos (A, B e C), dois polimórficos (A e B) e um monomórfico (C) com duas bandas. Borsoi Filho (1995) encontrou duas zonas de atividade com a primeira zona apresentando um loco monomórfico com três bandas, e a segunda zona de atividade mais de um loco, mostrando polimorfismo enzimático.

O sistema malato desidrogenase é citado por Kephart (1990), como uma enzima de estrutura dimérica com três locos. Em todos os trabalhos, inclusive este, foram observadas nas enzimas duas áreas bem distintas, uma monomórfica e outra polimórfica, apresentando diferentes números de bandas em ambas as regiões. Este sistema inclui isoenzimas encontradas no citoplasma, nas mitocôndrias e nos microssomos, o que pode resultar em zimogramas bastante complexos (Alfenas, 1998).

- Glutamato desidrogenase (GDH)

Este sistema apresentou um loco polimórfico. Cada indivíduo apresentou uma banda, tendo sido observados três fenótipos diferentes, representados na Figura 11. Borsoi Filho (1995) observou uma única zona de atividade com uma banda por indivíduo, os quais foram considerados homozigotos. Não foi observada nenhuma banda intermediária, talvez devido a este ter analisado somente seis cultivares de mandioca.

Faraldo (1999) descartou o sistema glutamato desidrogenase de suas análises por este apresentar homozigose para todos os indivíduos analisados, não sendo observado a presença de nenhum indivíduo heterozigoto. Os zimogramas apresentados pela autora assemelham-se aos obtidos neste trabalho.

Faraldo (1999) e Silva (2000) afirmam que os padrões de bandas observados no sistema GDH são preservados em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas, podendo conferir a este a função de marcador bioquímico na caracterização de germoplasma.

Figura 4. Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Glucose-6-fosfato desidrogenase (G₆PDH) com o loco A, alelos A₁ e A₂, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).

Figura 5. Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Isocitrato desidrogenase (IDH) com o loco A, alelos A₁ e A₂, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).

Figura 6. Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Fosfatase ácida (ACP) com o loco A, alelos A₁ e A₂, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).

Figura 7. Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a Enzima málica (ME) com o loco A, alelos A₁ e A₂, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).

Figura 8. Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Xiquimato desidrogenase (SKDH) com o loco A, alelos A₁, A₂, A₃ e A₄, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).

Figura 9. Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Leucina Aminopeptidase (LAP) com os locos A e B, alelos A₁, A₂ e B, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).

Figura 10. Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 11 acessos de mandioca para a enzima Malato desidrogenase (MDH) com os locos A e B, alelos A, B₁, B₂ e B₃, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).

Figura 11. Fotografia do gel e zimograma representando fenótipos de 13 acessos de mandioca para a enzima Glutamato desidrogenase (GDH) com o loco A, alelos A₁, A₂ e A₃, distância percorrida pelas bandas e pelo marcador de azul de bromofenol (M).

4.3 Variabilidade genética

As freqüências alélicas obtidas para os oito locos analisados nos sete grupos estão apresentadas na Tabela 6. Todos os grupos de acessos apresentaram polimorfismo para os locos dos oito sistemas, exceto o grupo de acessos da Bahia que apresentou um alelo fixado para o sistema ACP (o alelo 1), que pode ter sido devido ao pequeno número de acessos analisados neste grupo, somente quatro acessos. No grupo "Diversos", os alelos 3 da Gtdh-1 e 4 da Skdh-1 não se fazem presentes.

O número de alelos por loco variou de dois a quatro, sendo encontrados quatro para o sistema SKDH, três para os sistemas GDH e MDH, e dois para os sistemas ACP, G₆PDH, ME, CAP e IDH.

Foram observadas freqüências elevadas para alguns alelos, para todos os grupos, como os alelos 2 (Acp-1), 2 (Gtdh-1), 2 (Mdh-1), 1 (Me-1) e 1 (Idh-1), mostrando um padrão de distribuição dos alelos semelhante para todas as populações (grupos).

É interessante notar que no loco Lap-1 a distribuição das freqüências entre os dois alelos é proporcionalmente dividida, exceto para o grupo de Rondônia que apresenta o alelo 2 com freqüência bem maior que o outro alelo.

Para Hartl (1981), citado por Torggler et al (1995), "a freqüência alélica em uma amostra de indivíduos de uma população é somente uma estimativa da verdadeira freqüência alélica na população toda. Entretanto, se a amostra for suficientemente grande (100 ou mais indivíduos), a estimativa da freqüência alélica torna-se aproximada da verdadeira, e neste caso pode ser chamada de freqüência gênica".

Os resultados observados em relação à freqüência alélica dos 200 acessos não mostram diferenças significativas entre os grupos analisados, mesmo tendo acessos de diferentes procedências como cultivares melhoradas

e raças locais, de forma que os alelos mais comuns tendem a ser os mesmos para todos os grupos.

Tabela 6. Frequências alélicas de cada loco isoenzimático para os grupos de acessos de mandioca.

Locos	Grupos						
	Amazonas	Amapá	Bahia	Diversos	Pará	Rondônia	S/ Origem
Acp-1							
(n)	14	26	4	9	63	5	78
1	0,357	0,192	0,000	0,222	0,190	0,200	0,269
2	0,643	0,808	1,000	0,778	0,810	0,800	0,731
Gtdh-1							
(n)	13	23	3	9	55	4	73
1	0,077	0,196	0,333	0,111	0,291	0,250	0,329
2	0,538	0,500	0,333	0,889	0,436	0,500	0,521
3	0,385	0,304	0,333	0,000	0,273	0,250	0,151
G₆pdh-1							
(n)	14	25	4	9	64	4	78
1	0,393	0,380	0,375	0,444	0,422	0,500	0,442
2	0,607	0,620	0,625	0,556	0,578	0,500	0,558
Skdh-1							
(n)	14	25	4	9	61	4	75
1	0,393	0,400	0,375	0,500	0,344	0,125	0,307
2	0,107	0,260	0,000	0,333	0,238	0,250	0,280
3	0,321	0,280	0,125	0,167	0,254	0,500	0,300
4	0,179	0,060	0,500	0,000	0,164	0,125	0,113
Mdh-1							
(n)	14	25	4	8	58	5	72
1	0,393	0,420	0,375	0,313	0,431	0,300	0,444
2	0,429	0,540	0,375	0,438	0,457	0,600	0,451
3	0,179	0,040	0,250	0,250	0,112	0,100	0,104
Me-1							
(n)	13	22	3	8	49	4	68
1	0,731	0,864	0,667	0,688	0,755	0,875	0,706
2	0,269	0,136	0,333	0,313	0,245	0,125	0,294
Lap-1							
(n)	13	23	3	9	57	4	68
1	0,500	0,500	0,500	0,500	0,474	0,125	0,507
2	0,500	0,500	0,500	0,500	0,526	0,875	0,493
ldh-1							
(n)	14	26	4	9	63	5	77
1	0,607	0,731	0,500	0,722	0,746	0,700	0,734
2	0,393	0,269	0,500	0,278	0,254	0,300	0,266

(n) - número de acessos analisados por grupo.

A Tabela 7 mostra a frequência genotípica para cada loco isoenzimático dentro dos grupos de acessos analisados. Os sistemas GDH, G₆PDH, ME, LAP e IDH apresentaram três genótipos diferentes para o mesmo loco; o sistema ACP apresentou somente dois genótipos; o MDH apresentou seis genótipos e o sistema SKDH apresentou dez genótipos diferentes. Assim como na frequência alélica, observa-se na frequência genotípica, para a maioria dos grupos, uma frequência elevada para um ou no máximo dois genótipos: o genótipo 22 do Acp-1, 22 do Gdh-1, 12 do G₆pdh-1, 12 do Mdh-1, 11 e 12 do Me-1, 12 do Lap-1, e 11 e 12 do Idh-1, exceto no loco Skdh-1 que não apresentou predominância de nenhum genótipo para todos os grupos.

O genótipo 22 do Acp-1 no grupo da Bahia e o genótipo 12 do G₆pdh-1 no grupo de Rondônia apresentaram-se fixados.

A partir da estimativa das frequências alélicas foi possível avaliar a variabilidade genética apresentada na Tabela 8, observada nos grupos de *M. esculenta*, para os 8 locos estudados, em termos de número médio de alelos por loco, porcentagem de locos polimórficos, heterozigosidade esperada e observada.

O número médio de alelos por loco mostrou pouca variação, de 2,3 a 2,5. Os grupos da Bahia e o grupo Diversos apresentaram número médio de 2,3 enquanto os demais apresentaram 2,5. Faraldo (1999) obteve número médio de alelos por loco para 23 roças de mandioca variando de 1,5 a 2,1, com média de 1,9 alelos por loco, para onze sistemas enzimáticos analisados, acreditando que estes valores estariam sendo influenciados pelo pequeno tamanho de algumas roças (quatro roças representadas por apenas duas etnovariiedades).

Reis (1996), cita 56 trabalhos em populações naturais de espécies vegetais com número médio de alelos por loco variando de 1,0 a 4,2. O número médio de alelos encontrado pode ser em decorrência dos sistemas analisados apresentarem apenas um loco polimórfico avaliado e por cinco sistemas serem monoméricos (Acp, G₆pdh, Me, Lap e Idh), além do que só foram analisados

locos polimórficos. Se fossem incluídos na análise os locos monomórficos, os valores encontrados poderiam ser mais baixos. Houve também pouca variação detectada entre os grupos.

Tabela 7. Frequências genotípicas para cada loco isoenzimático dentro dos grupos de acessos de mandioca.

Locos	Grupos						
	Amazonas	Amapá	Bahia	Diversos	Pará	Rondônia	S/ Origem
Acp-1							
(n)	14	26	4	9	62	5	78
11	0,36	0,19	0,00	0,22	0,19	0,20	0,27
22	0,64	0,81	1,00	0,78	0,81	0,80	0,73
Gtdh-1							
(n)	13	23	3	9	54	4	73
11	0,07	0,17	0,33	0,12	0,28	0,25	0,33
22	0,50	0,48	0,33	0,88	0,44	0,50	0,52
33	0,36	0,30	0,33	0,00	0,28	0,25	0,15
G ₆ pdh-1							
(n)	14	25	4	9	64	4	78
11	0,07	0,04	0,00	0,23	0,11	0,00	0,10
12	0,64	0,68	0,75	0,44	0,63	1,00	0,68
22	0,29	0,28	0,25	0,33	0,26	0,00	0,22
Skdh-1							
(n)	14	25	4	9	61	4	75
11	0,29	0,15	0,00	0,33	0,15	0,00	0,07
12	0,07	0,19	0,00	0,22	0,15	0,00	0,16
13	0,07	0,27	0,00	0,11	0,14	0,00	0,24
14	0,07	0,00	0,75	0,00	0,10	0,00	0,08
22	0,00	0,12	0,00	0,22	0,10	0,00	0,13
23	0,14	0,07	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,25	0,05
33	0,14	0,04	0,00	0,11	0,10	0,00	0,12
34	0,14	0,12	0,25	0,00	0,08	0,00	0,04
44	0,07	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,03
Mdh-1							
(n)	14	25	4	8	58	5	72
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,50	0,80	0,50	0,38	0,77	0,40	0,72
13	0,28	0,04	0,25	0,25	0,09	0,20	0,17
22	0,14	0,12	0,00	0,25	0,05	0,40	0,07
23	0,07	0,04	0,25	0,00	0,03	0,00	0,04
33	0,00	0,00	0,00	0,12	0,05	0,00	0,00

(Continua)

Tabela 7. (Continuação)

Locos	Grupos						S/ Origem
	Amazonas	Amapá	Bahia	Diversos	Pará	Rondônia	
Me-1							
(n)	13	22	3	8	49	4	68
11	0,53	0,73	0,33	0,38	0,57	0,75	0,46
12	0,38	0,27	0,67	0,62	0,37	0,25	0,50
22	0,03	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,04
Lap-1							
(n)	13	23	3	9	57	4	68
11	0,31	0,30	0,00	0,22	0,26	0,00	0,34
12	0,38	0,40	1,00	0,56	0,42	0,25	0,34
22	0,31	0,30	0,00	0,22	0,32	0,75	0,32
ldh-1							
(n)	14	26	4	9	63	5	77
11	0,36	0,46	0,25	0,45	0,57	0,60	0,51
12	0,50	0,54	0,50	0,55	0,35	0,20	0,45
22	0,14	0,00	0,25	0,00	0,08	0,20	0,04

(n) - número de acessos analisados por grupo.

A porcentagem de locos polimórficos nos grupos variou entre 87,5 a 100%, considerando-se que um loco era considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassou a 0,95. Como esta medida é baseada no número de locos polimórficos dividido pelo número total de locos, e neste trabalho somente os locos polimórficos foram avaliados, era de se esperar que a maioria dos grupos apresentassem máximos valores de locos polimórficos. Somente o grupo da Bahia não apresentou 100% de locos polimórficos devido a este grupo apresentar no loco Acp-1 o alelo 2 fixado, comportando-se com monomórfico para todos os acessos do grupo. Esta medida de avaliação genética também é influenciada pelo número de indivíduos avaliados, isto é, pelo tamanho da amostra.

A heterozigosidade média observada ($\hat{H}_o$) para os grupos de acessos de mandioca variou de 0,381 a 0,615 (Tabela 8), sendo que o valor mais baixo foi observado no grupo de Rondônia (0,381) e o valor mais alto no

Tabela 8. Variabilidade genética observada nos grupos de acessos de mandioca para os oito locos isoenzimáticos analisados.

Grupos	Tamanho médio da amostra	Número médio de alelos por loco	Percentagem de locos Polimorficos ¹	Heterozigosidade Média	
				Observada	Esperada ²
Amazonas	13,6 (0,2)	2,5 (0,3)	100,0	0,409 (0,104)	0,544 (0,036)
Amapá	24,4 (0,5)	2,5 (0,3)	100,0	0,436 (0,112)	0,479 (0,055)
Bahia	3,6 (0,2)	2,3 (0,2)	87,5	0,615 (0,149)	0,559 (0,087)
Pará	58,8 (1,8)	2,5 (0,2)	100,0	0,408 (0,109)	0,507 (0,053)
Rondônia	4,4 (0,2)	2,5 (0,2)	100,0	0,381 (0,129)	0,495 (0,069)
Diversos	8,8 (0,2)	2,3 (0,2)	100,0	0,392 (0,092)	0,481 (0,055)
Sem origem	73,6 (1,5)	2,5 (0,3)	100,0	0,445 (0,115)	0,516 (0,042)

¹ O loco é considerado polimórfico se a frequência do alelo mais comum não exceder a 0,95.

² Estimativa não viesada de Nei (1978).

grupo da Bahia. Faraldo (1999) obteve valores de heterozigosidade média observada para 23 roças de mandioca de diferentes regiões geográficas em torno de 0,286 a 0,467.

Segundo Nei & Roychoredrury (1974), citados por Torggler et al (1995), a heterozigosidade observada está sujeita a várias limitações como: tamanho pequeno de populações, que pode desviar as frequências genotípicas das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, em função dos erros de amostragem; efeito de seleção natural forte, que pode ter operado em algum estágio de desenvolvimento antes da observação; e endogamia.

Este trabalho foi desenvolvido com acessos de um banco de germoplasma, onde existem materiais originados de roças (etnovariedades), materiais de lavouras comerciais (cultivares) e materiais de programas de melhoramento (clones selecionados, clones elites, cultivares, etc.), que possuem alta frequência de locos em heterozigose, como era de se esperar de uma espécie alógama altamente heterozigota e com propagação vegetativa, o que torna fácil a fixação dos híbridos da primeira geração após hibridação. Em decorrência destes fatos, era de se esperar que em bancos de germoplasma a heterozigosidade fosse maior que em roças.

Em populações naturais a heterozigosidade média esperada é um parâmetro para se comparar se a população está ou não em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Neste trabalho, a heterozigosidade média esperada (H_e) é considerada como um índice de diversidade para demonstrar a diversidade dos alelos de cada loco dentro do banco de germoplasma. A mesma variou de 0,479 a 0,559, mostrando-se mais alta que a heterozigosidade observada para quase todos os grupos, exceto para o grupo da Bahia que teve a maior heterozigosidade observada (0,615), possivelmente devido ao fato de que neste grupo há um baixo número de acessos. Lefèvre & Charrier (1993b), analisando 365 acessos de mandioca através de 20 locos isoenzimáticos, encontraram uma heterozigosidade esperada de 0,225, que mostrou menor magnitude que a observada neste trabalho.

4.4 Distribuição da diversidade

A Tabela 9 apresenta as estimativas de diversidade genética total (H_t), entre (G_{st}) e dentro (H_s) dos sete grupos de acessos avaliados, sendo constatada maior variabilidade dentro dos grupos de acessos que entre os mesmos. Os valores de G_{st} variaram de 0,006 a 0,080, com o valor mais baixo para o loco G_{6pdh-1} e o valor mais elevado para o loco G_{dh-1} . A concentração da variabilidade ocorreu dentro dos grupos, variando de 0,305 a 0,672. O valor

médio de G_{st} foi de 0,049, mostrando haver baixa variabilidade entre os grupos de acessos, concentrando-se a maior parte da variabilidade dentro dos grupos, estimada em 0,482. Este resultado é condizente com o padrão de distribuição da variabilidade observado para as freqüências alélicas (Tabela 6), uma vez que os alelos que encontram-se em freqüência elevada em um grupo, encontram-se também em freqüência elevada nos demais grupos, mostrando a menor variação observada entre grupos. A diferenciação maior encontra-se dentro dos grupos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Sambati (1998), analisando roças de mandioca utilizando caracteres morfológicos e isoenzimáticos, obtendo maior variabilidade dentro das roças que entre as roças. Faraldo (1999) também observou maior variabilidade dentro (0,367) das roças de diferentes regiões geográficas que entre (0,165) as roças. Mühlen (1999), através de marcadores de DNA (AFLP, RAPD e Microsatélites), analisou a diversidade genética de 55 acessos de mandioca, dos quais 45 da Região Amazônica, nove do Litoral Sul do Estado de São Paulo e a cultivar comercial Mantiqueira. A autora considerou o agrupamento das plantas em função do local de origem e observou que a variabilidade genética dentro dos grupos era superior à variabilidade entre os grupos.

Os resultados mostram um padrão de distribuição da variabilidade genética semelhante ao esperado em populações naturais de plantas alógamas. Silva (2000) estimou taxas de cruzamento variando de 69 a 100%, comprovando que a mandioca se reproduz por alogamia, o que explica o padrão de distribuição da variabilidade genética observado.

Tabela 9. Estimativas da diversidade genética total (H_T), entre grupos (G_{ST}) e dentro de grupos (H_S) nos 200 acessos de mandioca avaliados.

LOCOS	G_{ST}	H_T	H_S
Acp-1	0,061	0,325	0,305
Gdh-1	0,080	0,607	0,559
G6pdh-1	0,006	0,487	0,484
Skdh-1	0,078	0,730	0,672
Mdh-1	0,021	0,611	0,597
Me-1	0,032	0,369	0,357
Lap-1	0,068	0,493	0,459
Idh-1	0,032	0,437	0,423
Todos os locos	0,049	0,507	0,482

(H_T) - diversidade genética total da espécie.

(H_S) - componente de diversidade, dentro de populações (grupos).

(G_{ST}) - proporção da diversidade genética entre populações (grupos).

4.5 Análise da similaridade entre os grupos de acessos

Os dendrogramas gerados a partir das matrizes de similaridade, baseados nos padrões eletroforéticos, de cada grupo de acessos, podem ser observados nas Figuras 12 a 18. Não foi possível reunir os 200 acessos em um único dendrograma, o que talvez fosse o ideal, para se detectar acessos duplicados e observar melhor os agrupamentos, optando-se por confeccionar um dendrograma para cada grupo de acessos. Não foram observados grupos muito distintos dentro de cada dendrograma avaliado. Entretanto, detectou-se grande variabilidade entre os acessos avaliados de cada grupo. Para a maior parte dos dendrogramas (Figuras 13, 14, 16, 17 e 18) observou-se acessos que apresentam menos de 50% de similaridade pelo Índice de Jaccard, mostrando um alto grau de divergência entre os mesmos.

No entanto, apesar do alto nível de variabilidade encontrado, foram observados acessos duplicados (Índice de Jaccard igual a 1,00) em alguns grupos.

A Figura 13 mostra o dendrograma formado pelos acessos do Pará que mostraram seis pares de acessos (216 e 292, 267 e 303, 334 e 352, 214 e 342, 294 e 295, 236 e 281), que apresentam o mesmo padrão fenotípico. No entanto, na Tabela 10, onde estão reunidos todos os 200 acessos num só agrupamento, foram verificados apenas três pares de acessos com o mesmo padrão fenotípico (267 e 303; 309 e 310; e 321 e 328).

Comparando-se o genótipo dos acessos considerados similares no dendrograma do grupo do Pará com a Tabela 10, pode-se observar que os acessos 216 e 292 não são necessariamente semelhantes já que o acesso 292 teve três locos não avaliados. Como para os outros locos os dois acessos se assemelham foram conseqüentemente considerados similares no dendrograma.

Os acessos 267 e 303 apresentam o mesmo padrão genotípico também na Tabela 10. Apesar de terem nomes diferentes (676 e cearense bacuri) podem ser o mesmo material, podendo estar duplicados no banco de germoplasma.

O par de acessos 334 e 352, considerados semelhantes no dendrograma do Pará, na Tabela 10 mostraram também que são semelhantes para seis locos; porém, no acesso 334 dois locos não foram avaliados por não apresentarem boa resolução para interpretação. O par de acessos 214 e 342, foi semelhante para sete locos na Tabela 10, sendo que o quinto loco não foi avaliado no acesso 214.

De acordo com a Tabela 10, o par 294 e 295 assemelha-se em cinco locos; no entanto, três locos no acesso 295 e dois locos no acesso 294 não foram avaliados. No par 236 e 281, ocorreu que o sétimo loco do 281 e o primeiro, quinto e sexto locos do 236 não foram avaliados, causando assim a aproximação destes acessos no dendrograma.

Figura 12. Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 5 acessos de mandioca pertencentes ao grupo de Rondônia, utilizando-se coeficiente de Jaccard e algoritmo U.P.G.M.A.

Figura 13. Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 64 acessos de mandioca pertencentes ao grupo do Pará, utilizando-se coeficiente de Jaccard e algoritmo U.P.G.M.A.

Figura 14. Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 9 acessos de mandioca pertencentes ao grupo Diversos utilizando-se coeficiente de Jaccard e algoritmo U.P.G.M.A.

Figura 15. Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 4 acessos de mandioca pertencentes ao grupo da Bahia, utilizando-se coeficiente de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M.A.

Figura 16. Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 14 acessos de mandioca pertencentes ao grupo do Amazonas, utilizando-se coeficiente de Jaccard e algoritmo U.P.G.M.A.

Figura 17. Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 26 acessos de mandioca pertencentes ao grupo do Amapá, utilizando-se coeficiente de Jaccard e algoritmo U.P.G.M.A.

O dendrograma dos acessos do grupo Amapá (Figura 17) apresentou pares de acessos muito similares (219 e 297, 285 e 346). O primeiro par assemelha-se em apenas três locos, sendo que os demais locos não apresentaram condições de análise. O segundo par, 285 e 346, apresenta-se similar em seis locos na Tabela 10, sendo que houve descarte de dois locos no indivíduo 285.

No grupo de acessos "sem origem", o dendrograma formado na Figura 18 mostra dois agrupamentos com dois pares de acessos similares (241 e 288; 321 e 328) e um grupo com três acessos similares (213, 283 e 293). Com base na comparação dos fenótipos na Tabela 10, pode-se observar que os acessos 241 e 288 assemelham-se por quatro locos avaliados, e que no acesso 288 foram analisados apenas quatro locos. No agrupamento formado por três acessos (283, 293 e 213), ocorreu o mesmo fato. Somente o par de acessos 321 e 328, para os quais foram analisados todos os oito locos, a similaridade é completa.

Quando se agrupou todos os 200 acessos na Tabela 10, observou-se pares de acessos similares para os oito locos analisados, independentes dos grupos de acessos a que fazem parte. Desta forma, foram detectados três pares de acessos: 267 e 303 (originados do Pará), 309 e 310 (originados do Pará e Amazonas) e, por último, 321 e 328 (ambos sem origem definida).

Os dados mostram a necessidade de se trabalhar com um número maior de locos para se diferenciar os indivíduos, pois quanto menor o número de locos analisados, graus de similaridade mais próximos são encontrados entre os acessos. A aproximação de muitos acessos nos dendrogramas foi devido a estes apresentarem poucos locos analisados. Com base nestas observações, o uso de marcadores moleculares, como RAPD, AFLP ou Microssatélites (Milach, 1998), que apresentam de modo geral grande polimorfismo, bem como um número maior de marcadores, seria mais

recomendado do que isoenzimas para a identificação de acessos duplicados em bancos de germoplasma.

A identificação de materiais repetidos em bancos de germoplasma reduz os gastos com a manutenção de acessos, que no caso da mandioca geralmente são mantidos em coleções no campo, os quais necessitam de tratamentos culturais periódicos (adubação, aplicação de defensivos, etc.) e replantio anual, o que aumenta os custos com mão-de-obra, equipamentos, combustível para máquinas, entre outros, além de ocuparem imensas áreas.

A avaliação através da análise eletroforética de acessos em bancos de germoplasma contribui também para a identificação de acessos com maior ou menor grau de genes em heterozigosidade e homozigosidade, com o objetivo de aumento da heterose em materiais visando o melhoramento genético.

Tabela 10. Comparação dos genótipos dos 200 acessos utilizados para detecção de indivíduos semelhantes para os oito locos avaliados, com código de identificação, nome local e origem.

	CÓDIGO	GENÓTIPO (8 locos)	NOME LOCAL	ORIGEM
Paró→	DG 236	00 22 12 13 00 00 12 11	549	PA
	DG 282	11 00 11 00 12 00 00 22	CPM 0703	PA
	DG 289	11 00 12 11 22 12 00 11	116 (Cidade Rica)	sem origem
	DG 316	11 11 11 22 23 12 11 11	CPM - 1425	sem origem
	DG 362	11 11 12 13 12 11 22 11	BGM -087	sem origem
	DG 380	11 11 12 14 12 12 12 12	Cinzenta	sem origem
	DG 386	11 11 12 14 12 12 22 12	Amarela	sem origem
	DG 340	11 11 12 22 13 00 22 11	Jaboti	sem origem
	DG 322	11 11 12 24 22 11 22 11	Arrozina (RO)	RO
	DG 357	11 11 22 11 12 12 12 12	Pau de xexeú 1-BGM0905	sem origem
	DG 387	11 11 22 13 12 11 22 22	EAB - 668	PA
	DG 200	11 11 22 23 12 12 12 12	Maranhense 2	PA
	DG 320	11 11 22 23 12 12 22 11	Maranhense 1	sem origem
	DG 402	11 11 22 24 12 11 22 11	Tareza	sem origem
	DG 372	11 12 12 12 12 11 11 12	Peruana	AP
	DG 277	11 22 11 13 12 00 11 11	EAB 942	PA
	DG 376	11 22 11 34 23 11 11 11	Nova Timbotena	sem origem
	DG 256	11 22 12 11 12 00 22 11	Guanamara	PA
	DG 311	11 22 12 11 13 11 12 12	Apinagé	AP
	DG 345	11 22 12 11 13 12 12 12	Vovô	AM
	DG 238	11 22 12 13 12 11 12 12	Sem Nome	sem origem
	DG 379	11 22 12 13 12 11 22 11	Aipim quintal	sem origem
	DG 333	11 22 12 13 12 12 12 12	Pão Manaus	sem origem
	DG 353	11 22 12 13 12 22 11 11	Brasileirinha (Biotec.)	sem origem
	DG 397	11 22 12 14 12 11 12 22	EAB - 1123	PA
	DG 308	11 22 12 14 13 12 12 11	Clone 8911	sem origem
	DG 317	11 22 12 22 13 12 12 12	IAC - 52230	sem origem
	DG 201	11 22 12 24 12 11 12 11	EAB - 675	PA
	DG 358	11 22 12 24 12 12 12 12	Itapuia	PA
	DG 330	11 22 12 33 12 11 22 12	IAC - 2870	sem origem
	DG 323	11 22 12 44 12 12 22 11	Boião	PA
	DG 381	11 22 22 11 00 00 12 12	Pingo de Ouro 2	MA
	DG 368	11 22 22 11 12 11 11 11	Amarela tóxica	AP
	DG 314	11 22 22 13 12 11 22 12	Gavião	sem origem
	DG 305	11 22 22 14 22 12 11 11	Sem Nome 2	AM
	DG 203	11 22 22 22 33 12 12 12	SRT 1105 (Mico)	SC
	DG 383	11 22 22 23 13 11 22 12	Klaisnasik	AM
	DG 331	11 33 11 34 13 12 12 11	Vizeu	AM

(Continua)

Tabela 10. (Continuação)

	CÓDIGO	GENÓTIPO (8 locos)	NOME LOCAL	ORIGEM
	DG 224	11 33 12 11 22 11 22 12	Uapixuna	AM
	DG 382	11 33 12 12 12 12 11 12	BGM - 037	sem origem
	DG 378	11 33 12 13 12 11 11 11	Ouricuri	sem origem
	DG 209	11 33 12 22 13 12 22 12	Mandioca 645 (EAB645)	sem origem
	DG 391	11 33 12 22 23 11 12 12	Santarém	AP
	DG 366	11 33 12 23 22 12 12 12	IM - 230	AP
	DG 390	11 33 12 34 12 11 22 22	Milton 2	PA
	DG 361	11 33 22 23 12 11 12 12	Pingo de Ouro	PA
	DG 400	11 33 22 33 33 11 11 11	Tumasea	PA
Par9→	DG 288	22 00 11 00 12 00 00 12	Agua Morna	sem origem
Par5→	DG 295	22 00 11 33 12 00 00 11	Milagrosa RG	PA
Par5→	DG 294	22 00 11 33 12 12 00 11	IM 280	PA
Par6→	DG 297	22 00 12 00 00 00 00 12	Siolina	AP
Trio1→	DG 283	22 00 12 00 12 00 00 12	Branca Ouro	sem origem
Par1→	DG 292	22 00 12 00 12 00 00 12	Mirim	PA
Trio1→	DG 293	22 00 12 00 12 00 00 12	Flor de Boi	sem origem
	DG 284	22 00 12 00 13 00 00 22	Vermelhão	RO
Par3→	DG 334	22 00 12 11 12 00 22 11	Macaxeirão	PA
	DG 286	22 00 12 11 12 11 00 11	Cachimbo	AM
	DG 290	22 00 12 13 12 11 00 12	Olho verde-BGM1469	PA
Par8→	DG 285	22 00 12 13 12 12 00 12	Amarelinha	AP
	DG 270	22 00 12 14 12 11 22 11	Cultivar precoce	PA
	DG 299	22 00 12 33 12 11 00 12	IAC - Mantiqueira	sem origem
	DG 298	22 00 12 34 13 12 00 12	Abacate	BA
	DG 291	22 00 12 34 22 12 00 11	Lesa	PA
	DG 280	22 00 22 13 13 12 12 12	Olho verde 2	PA
	DG 287	22 00 22 22 12 11 00 11	Saracura 2	AP
	DG 237	22 11 00 22 12 11 22 12	Preta 2	AP
	DG 262	22 11 11 11 12 11 11 12	Nanivin	sem origem
	DG 276	22 11 11 13 22 11 22 11	Manteiga	AP
	DG 394	22 11 12 11 12 12 12 11	EAB - 591	PA
	DG 268	22 11 12 11 12 12 22 11	3 Meses	sem origem
Par3→	DG 352	22 11 12 11 12 22 22 11	EAB - 645	PA
	DG 296	22 11 12 12 00 11 00 00	CPM 0501	sem origem
	DG 347	22 11 12 12 00 12 22 12	Maniçobeira	sem origem
	DG 375	22 11 12 12 12 11 11 11	F 5077	PA
	DG 226	22 11 12 12 12 11 22 12	Amarela amariaçu	PA
	DG 221	22 11 12 12 12 12 22 11	Tucun	PA
	DG 242	22 11 12 13 12 00 11 11	Jacaré	sem origem
	DG 395	22 11 12 13 12 11 12 11	Jamamadi 1	PA
	DG 384	22 11 12 13 12 11 12 12	Pretinha	AP
	DG 244	22 11 12 13 13 00 11 12	Acari	sem origem
	DG 202	22 11 12 14 33 11 22 12	Pretinha SDC	PA

(Continua)

Tabela 10. (Continuação)

	CÓDIGO	GENÓTIPO (8 locos)	NOME LOCAL	ORIGEM
	DG 246	22 11 12 22 12 00 12 11	Chapéu de sol (Viseu)	PA
	DG 355	22 11 12 22 12 11 12 12	Saracura	sem origem
	DG 371	22 11 12 22 22 11 12 11	Jararaca 1	sem origem
	DG 367	22 11 12 23 22 11 11 11	CPM - 276	PA
	DG 344	22 11 12 24 00 11 12 12	Galibi	PA
	DG 401	22 11 12 24 12 12 22 12	Branquinha	sem origem
	DG 338	22 11 12 33 12 12 22 11	IAC - 576/70	sem origem
	DG 307	22 11 12 33 13 12 12 12	Pirarucu	sem origem
	DG 255	22 11 12 34 00 00 12 11	EAB 1108	sem origem
	DG 393	22 11 12 34 12 12 12 11	EAB - 425	PA
Par1→	DG 216	22 11 12 34 12 12 12 12	Amarela 1	PA
	DG 398	22 11 12 34 23 12 12 22	Pacajás	sem origem
	DG 217	22 11 22 00 00 11 12 11	Açaí	PA
	DG 399	22 11 22 11 12 11 11 00	Cacau amarela	PA
	DG 239	22 11 22 13 12 11 12 12	Imitação	PE
	DG 306	22 11 22 13 12 12 11 11	Wick	AP
	DG 312	22 11 22 14 12 11 12 12	Bragança	BA
	DG 266	22 11 22 22 12 11 11 11	8816-012	sem origem
	DG 319	22 11 22 22 12 11 12 11	Branquinha	sem origem
	DG 327	22 11 22 24 12 12 12 11	Witadehemesik	sem origem
	DG 363	22 11 22 34 12 11 11 11	Bata Uaça	AM
	DG 388	22 22 00 33 22 11 12 11	Boa Fama	RO
Par9→	DG 241	22 22 11 12 12 00 00 12	Mandiocaba	sem origem
	DG 261	22 22 11 12 12 12 22 11	0020 Iracema	sem origem
	DG 205	22 22 11 22 12 11 22 11	Caranaçu 1	AC
	DG 335	22 22 11 23 12 12 11 11	CPATU - 133	PA
	DG 389	22 22 11 33 00 11 12 12	CPM - 111	sem origem
	DG 364	22 22 11 33 13 12 11 11	EAB - 687	PB
	DG 254	22 22 12 11 12 00 12 11	Itaúba	AP
	DG 396	22 22 12 11 12 11 11 22	Panela	AM
	DG 301	22 22 12 11 13 12 12 11	Altamira	PE
	DG 356	22 22 12 11 22 11 12 12	Calzavara	PE
	DG 230	22 22 12 12 12 11 11 12	Agami	AP
	DG 234	22 22 12 12 12 11 12 12	Tumase	AP
	DG 339	22 22 12 12 12 12 00 11	Biotechnologia 1	sem origem
	DG 231	22 22 12 12 12 12 12 11	Sutinga (ração animal)	PA
Trio1→	DG 213	22 22 12 12 12 12 12 12	Jurará	sem origem
	DG 206	22 22 12 12 12 12 22 12	Caranaçu 2	AC
	DG 369	22 22 12 12 13 11 12 11	Mameluca	sem origem
	DG 232	22 22 12 12 22 11 11 12	BGM 116 (Cigana Preta)	sem origem
	DG 228	22 22 12 12 22 12 11 11	Osso duro	PB
	DG 272	22 22 12 13 12 11 11 12	Mantiqueira 0211	sem origem
	DG 271	22 22 12 13 12 11 22 11	588	sem origem

(Continua)

Tabela 10. (Continuação)

	CÓDIGO	GENÓTIPO (8 locos)	NOME LOCAL	ORIGEM
	DG 377	22 22 12 13 12 12 22 11	CPM - 2438	sem origem
	DG 274	22 22 12 13 12 12 22 12	Orana	RO
Par6→	DG 281	22 22 12 13 12 22 00 11	Ereta	PA
	DG 248	22 22 12 13 13 00 00 11	Cearense 2	sem origem
	DG 359	22 22 12 13 13 12 12 12	Boi	AM
	DG 265	22 22 12 13 23 11 22 12	Amarela 1	PA
	DG 392	22 22 12 14 12 11 11 12	Olho Preto	sem origem
Par2→	DG 267	22 22 12 14 12 11 22 12	EAB 676	PA
Par2→	DG 303	22 22 12 14 12 11 22 12	Cearense bacuri	PA
	DG 341	22 22 12 14 12 12 12 22	Hamburguesa	BA
	DG 349	22 22 12 14 13 12 12 11	Jaburu	sem origem
	DG 210	22 22 12 14 13 12 12 12	Casca roxa	PA
	DG 354	22 22 12 22 00 12 22 12	Amarela	sem origem
	DG 263	22 22 12 22 12 11 11 12	Bahia	PA
	DG 225	22 22 12 23 12 11 12 11	Saracura	AP
	DG 318	22 22 12 23 12 11 12 12	Inajá	sem origem
	DG 253	22 22 12 33 12 00 11 12	Preta 1	AP
	DG 329	22 22 12 33 12 11 11 11	SRT-1310 (Pioneira)	sem origem
	DG 337	22 22 12 33 12 12 11 11	BGM - 062	sem origem
	DG 351	22 22 12 33 12 22 12 11	Macaxeira 25	sem origem
	DG 309	22 22 12 33 12 22 12 12	121 59M-mex	PA
	DG 310	22 22 12 33 12 22 12 12	EAB 708	AM
	DG 208	22 22 12 33 13 11 11 11	Olho Roxo	sem origem
Par7→	DG 219	22 22 12 34 12 12 12 12	Soi Preto	AP
	DG 249	22 22 12 44 12 00 11 12	EAB 1121	AM
Par10→	DG 321	22 22 12 44 12 12 11 11	CPM - 004	sem origem
Par10→	DG 328	22 22 12 44 12 12 11 11	Ouricuri	sem origem
	DG 235	22 22 22 11 13 12 22 11	Amarelona	PA
	DG 247	22 22 22 12 00 00 22 11	Tapioqueira	PA
	DG 212	22 22 22 12 12 11 11 11	Duquinha	PA
	DG 304	22 22 22 12 12 11 12 11	Tataruaia	sem origem
	DG 275	22 22 22 12 12 11 22 11	Pretona ereta	AP
	DG 229	22 22 22 12 22 11 11 11	Inajazão	sem origem
	DG 220	22 22 22 13 12 11 11 12	Lo urukavá	sem origem
	DG 336	22 22 22 13 12 22 12 11	Medicilândia	sem origem
	DG 273	22 22 22 14 13 12 11 12	Clone 4919	sem origem
Par4→	DG 214	22 22 22 22 00 11 12 11	BGM 019 (Xingu)	PA
Par4→	DG 342	22 22 22 22 12 11 12 11	Belterra	PA
	DG 350	22 22 22 23 12 11 22 12	Castanha	sem origem
	DG 365	22 22 22 23 12 12 11 22	IM - 341	sem origem
	DG 204	22 22 22 24 12 12 22 12	Maragogibe	sem origem
	DG 315	22 22 22 33 12 11 11 12	Xingu	PA
	DG 257	22 22 22 34 12 00 12 11	Preta esgalhada	AP

(Continua)

Tabela 10. (Continuação)

	CÓDIGO	GENÓTIPO (8 locos)	NOME LOCAL	ORIGEM
	DG 207	22 22 22 34 12 11 22 11	Man. Raimundo José	AP
	DG 325	22 22 22 44 13 11 12 11	Amarela 2	PA
	DG 326	22 33 11 12 00 12 22 11	Olho roxo de Altamira	PA
	DG 260	22 33 11 12 12 12 22 12	Milagrosa 2	PA
	DG 278	22 33 11 13 22 12 11 11	EAB 630	sem origem
	DG 252	22 33 12 11 22 00 11 11	Feifim	PA
	DG 223	22 33 12 11 22 11 22 11	Rouei	AP
	DG 222	22 33 12 11 33 11 12 12	EAB 1156	PA
	DG 233	22 33 12 12 12 11 11 12	Palikura pequena	AP
	DG 374	22 33 12 12 12 11 11 22	Cearense SDC	PA
	DG 385	22 33 12 12 12 11 12 12	IM - 186	sem origem
	DG 300	22 33 12 13 12 12 12 11	EAB 1195	PA
	DG 279	22 33 12 13 12 12 22 11	Sem Nome 1	AP
Par8→	DG 346	22 33 12 13 12 12 22 12	Inambu roxa	AP
	DG 348	22 33 12 13 12 12 22 12	Sem Nome	sem origem
	DG 258	22 33 12 14 23 00 12 11	Gurijuba	BA
	DG 245	22 33 12 22 12 00 12 11	Aipim rosa	PA
	DG 211	22 33 12 22 12 11 11 11	Iracema	PA
	DG 332	22 33 12 22 12 12 12 12	Jamamadi 2	sem origem
	DG 218	22 33 12 23 12 11 22 11	Orenina	RO
	DG 343	22 33 12 23 12 12 11 22	CPM 2424	sem origem
	DG 360	22 33 12 23 13 11 22 11	0080- Engana Ladrão	sem origem
	DG 264	22 33 12 23 23 11 22 11	Ibaisik	AM
	DG 227	22 33 12 23 23 12 12 12	EAB 688	PA
	DG 313	22 33 12 33 12 12 12 12	Javarite	AM
	DG 250	22 33 12 34 12 00 11 11	Louis Petit	PA
	DG 302	22 33 22 11 12 11 22 11	Pau de xexeú 2	sem origem
	DG 373	22 33 22 12 12 11 22 22	Bato Kamomie Noie	AM
	DG 259	22 33 22 13 00 00 00 11	38 Fio de Ouro	sem origem
	DG 370	22 33 22 13 12 11 11 11	Pecuí	AP
	DG 243	22 33 22 33 12 00 22 11	Camarão 2	PA
	DG 251	22 33 22 44 12 00 11 12	Olho Verde	PA
	DG 240	33 22 22 11 13 00 11 12	Engana ladrão	PA

¹ Par1 a Par10 - pares de acessos semelhantes para alguns locos avaliados, e considerados idênticos nos dendrogramas; ² Trio1 - Trinca de acessos semelhantes para alguns locos avaliados, e considerados idênticos nos dendrogramas; ³ Área sombreada - pares de acessos idênticos para os oito locos avaliados.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, foram retiradas as seguintes conclusões:

- Os marcadores isoenzimáticos são de grande utilidade para o estudo de variabilidade genética, seja em bancos de germoplasma ou em populações naturais.

- O material avaliado apresentou grande variabilidade isoenzimática.

- O número médio de alelos por loco variou de 2,3 a 2,5. A heterozigosidade média observada ($\hat{H}_o$) variou de 0,381 a 0,615, mostrando ser este material bastante heterozigoto. A heterozigosidade média esperada ($\hat{H}_e$) variou de 0,479 a 0,559.

- A variabilidade genética dos acessos agrupados de acordo com suas origens mostra que há maior variabilidade genética dentro dos grupos que entre grupos, sugerindo um padrão de distribuição de variabilidade genética semelhante ao esperado para populações naturais de espécies alógamas.

- Para os oito locos avaliados foram encontrados somente três pares de acessos duplicados. Para que se possa detectar um maior número de possíveis acessos duplicados, sugere-se o emprego de maior número de locos isoenzimáticos polimórficos, ou marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M.; CARDOSO, E.M.R. **A mandioca no trópico úmido**.
Brasília: Editerra, 1980. 251p.

ALFENAS, A.C. (ed) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins:**
fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998.
574p.

ALLEM, A.C. *Manihot* germoplasm collecting priorities. In: International network
for cassava genetic resources. **International Crop Network Series**, IPGRI,
v. 10, p. 87-110, 1994.

BORSOI FILHO, J.L. Variedade isoenzimática e divergência genética de seis
cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Viçosa, 1995. 52p.
Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Viçosa.

BREWER, G.L.; SING, C.F. **An introduction to isozyme techniques**. New
York: Academic Press, 1970. 1986p.

BRONDANI, C. Análise isoenzimática de dois híbridos putativos naturais de
espécies silvestres do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae). **Pesquisa
Agropecuária Brasileira**, v.31, n.9, p.639-643, 1996a.

- BRONDANI, C. Variação isoenzimática de três espécies do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae) relacionados morfologicamente à mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.4, p.287-289, 1996b.
- CAMPOS, A.D. Modificações após a colheita no grau de deterioração fisiológica e composição química das raízes de três cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Lavras, 1987, 80p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- CARVALHO, C.G.P. Hibridação interespecífica da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com espécies afins. Viçosa, 1995. 56p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Viçosa.
- CHELIAK, W.M.; PITEL, J.A. **Techniques for starch gel electrophoresis from forest tree species**. s.1, Information report, 1984, 49p.
- CLAYTON, J.; TRETIK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **J. Fisheries Research Board Canadian**, v.29, p.1169-1172, 1972.
- CONCEIÇÃO, A.J. **A mandioca**. 3 ed. São Paulo: Nobel, 1987. 382p.
- COSTA, I.R.S.; MORALES, E.A.V. Cassava Genetic Resources in South America. In: **1ST MEETING OF THE INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES**, IPIGRI, 1994, p.16-20.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Divergência genética. In: **Modelos biométricos aplicados ao melhoramentos genético**. Viçosa: UFV, 1994. Cap.6, p.227-314.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM MANDIOCA E FRUTICULTURA (EMBRAPA/CNPMF). VIII Curso intensivo nacional de mandioca. Cruz das Almas: CNPMF, 1v. , 1993.

EPPERSON, J.E.; PACHICO, D.H.; GUEVARA, C.L. A cost analysis of maintaining cassava plant genetic resources. **Crop Science**. v.37, p.1641-1649, 1997.

FARALDO, M.I.F. Distribuição da variabilidade genética e caracterização isoenzimática de etnovariedades em roças de mandioca (*M. esculenta* Crantz) do Brasil. Piracicaba, 1999. 117p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996. 220p. (Documento EMBRAPA-CENARGEM, n. 20).

FUKUDA, W.M.G. Melhoramento da mandioca. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999, p.410-428.

FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; VILARINHOS, A.D.; OLIVEIRA, R.P. **Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMF, 1996. (Documentos CNPMF, n. 68).

GRANER, E.A. **Contribuição para o estudo citológico da mandioca**. Piracicaba: ESALQ/ Departamento de Genética, 1935. 28p.

- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. Amsterdam: North-Holland, 1978. 1v.
- HERSHEY, C.; AMAYA, A. Germoplasma de yuca: evolucion, distribucion y coleccion. In: DOMINGUEZ, C.E. **Yuca: investigación, produccion y utilización**. Cali: PNUD/CIAT. 1989. cap.2, p.77-112.
- HUSSAIN, A.; BUSHUK, W.; RAMIREZ, H.; ROCA, W. Identification of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes. **Seed Science & Technology**, v.15, p.19-22, 1987.
- JAIN, S.K.; SINGH, R.S. Population biology of *Avena*. VII. Allozyme variation in relation to the genome analysis. **Botanical Gazette**, v.40, n.3, p.356-362, 1979.
- KEPHART, S.R. Starch gel eletrophoresis of plant isozyme: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, v.77, n.5, p.693-712, 1990.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **MEGA - molecular evolutionary analysis**. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, University Park: Pennsylvania State University, 1993.
- LACERDA, C.M.B. Diversidade genética por isoenzimas em populações naturais de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Freire F.& M.F. Allemão) anacardiaceae no Semi-árido. Piracicaba, 1997. 105p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- LEFÈVRE, F.; CHARRIER, A. Heredity of seventeen loci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v.66, n.3, p.171-178, 1993a.

- LEFÈVRE, F.; CHARRIER, A. Isozyme diversity within African *Manihot* germophasm. **Euphytica**, v.66, n.3, p.73-80, 1993b.
- LEITÃO FILHO, H.F. Caracterização botânica de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **O Agrônômico**, v.23, p.73-81, 1971.
- MILACH, S.K.C. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: Workshop Sobre Biossegurança, Proteção de Cultivares, Acesso aos Recursos Genéticos e Propriedade Industrial na Agropecuária, viçosa, 1998. **Resumos**. Viçosa: UFV, 1998. p.43-58.
- MONTALDO, A. **La yuca o mandioca**. San José: Editorial IICA, 1979. 386p. (Série: Libros y materiales educativos, 38)
- MÜHLEN, G.S. Avaliação da diversidade genética de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e Microssatélites. Piracicaba, 1999. 176p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- NEI, M. analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p. 583-590, 1978.
- NORMANHA, E.S. Diferenças entre mandioca mansa e brava. **O Agrônômico**, v.8, p.14, 1956.

- OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National academy of Sciences of USA**, v. 99, p. 5586-5591, 1999.
- PAIVA, J. R. Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira (*Hevea brasiliensis* (wild. Ex. Adr. De Juss.) Muell. Arg.). Piracicaba, 1992, 145p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PEREIRA, S.C.; CARVALHO, D.A. Botânica da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Informe Agropecuário**, v.5, p.31-40, 1979.
- PERONI, N. Taxonomia folk e diversidade intra-específica de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em roças de agricultura tradicional em áreas da Mata Atlântica do Sul do Estado de São Paulo. Piracicaba, 1998. 191p. Dissertação. (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PERRY, B.A. Chromosome number and phylogenetic relationship in the Euphorbiaceae. **American Journal of Botany**, v.30, p.527-543, 1943.
- REIS, M.S. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius). Piracicaba, 1996. 210p. Tese. (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RIBEIRO FILHO, J. **Cultura da mandioca**. Viçosa: Escola Superior de Agricultura, 1976. 80p.

- ROGERS, D.J. Studies of *Manihot esculenta* Crantz and related species. **Bull Torrey Botany Club**, v.90, n.1, p.43-54. 1963.
- ROGERS, D.J.; APPAN, S.G. *Manihot* and manihotoides (Euphorbiaceae). **Flora Neotrópica**, 1973. 272p. (Monograph. nº 13).
- ROGERS, D.J.; FLEMING, H.S. A monograph of *Manihot esculenta* Crantz. **Economic Botany**, v.27, n.1, p. 1-114, 1973.
- SAMBATTI, J.B.M. Erosão genética e conservação de germoplasma de mandioca na agricultura autóctone em Ubatuba - SP. Piracicaba, 1998. 165p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria sócio-econômica. **Informações Econômicas**, v.27, n.11, 175p., nov., 1999.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. **Biochemical Genetics**, v.3, p.37-79, 1969.
- SCHMIDT, C.B. A mandioca: contribuição para o conhecimento de sua origem. **Boletim de Agricultura**, v. 52, p.53-128, 1951.
- SHAW, C.R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes – a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, v.4, p.297-320, 1970.
- SILVA, R.M. Sistema reprodutivo, Fluxo gênico e paternidade em roças de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) Piracicaba, 2000.

131p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SOLTIS, D.E.; HAUFLE, 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**, v.73, n.1, p.9-26, 1983.

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.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **ISOENZIMAS: variabilidade genética em planta**. Ribeirão Preto: SBG, 1995. 186p. (Série monografias, 1).

UMANAH, E.E.; HARTMANN, R.W. Chromosome numbers and Karyotypes of some *Manihot* species. **Journal American Society Horticultural Science**, v.98, n.3, p.272-274, 1973.

VAN SLOTEN, D.H. the role of curators, breeders and other users of germplasm in characterization and evaluation of crop genetic resources . IBPGR/SEAN. Special Issue: 3-8, 1987.

WENDEL, J.F.; WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. (Ed.) **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. Cap. 1, p.5-45.