**SISTEMA REPRODUTIVO, FLUXO GÊNICO E
PATERNIDADE EM ROÇA DE ETNOVARIEDADES
DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

RAINÉRIO MEIRELES DA SILVA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. GERHARD BANDEL

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 2000

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

Silva, Rainério Meireles da

Sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade em roça de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) / Rainério Meireles da Silva. - Piracicaba, 2000.
131 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Cruzamento vegetal 2. Diversidade genética 3. Mandioca 4. Polinização cruzada 5. Recurso genético 6. Reprodução vegetal I. Título

CDD 633.4

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

A memória do Prof. Dr. Paulo Soderro Martins por tudo o que fez em prol do estudo da evolução e domesticação das espécies tropicais, mas, principalmente, pela oportunidade de conviver com um ser humano, que, como poucos, conseguiu ser equilibrado em todos os campos da vida.

OFEREÇO

Ao meu pai Raimundo André
Aos meus queridos irmãos Rai-klem, Raulam e Rosinelma
As minhas primas Angelita e Amanda
Ao meu cunhado Sidney,
Aos meus lindos sobrinhos Bianca e Henrique, e em especial, a Dona Sitônia (avó), Dona Naza (mãe) e Maria Rita (futura esposa) mulheres que com muita compreensão e sabedoria em suas vidas não mediram esforços para a minha formação.

Dedico esta Tese à minha família, pois é o bem mais precioso que possuo. Assim como a população é a base para a evolução das espécies, a roça é a unidade básica da dinâmica evolutiva da mandioca, a família é a unidade básica para a estruturação de uma sociedade mais harmoniosa, justa, e feliz.

DEDICO

Agradecimentos

- Ao Departamento de Genética pela possibilidade de realização deste curso.
- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.
- Ao Prof. Dr. Gerhard Bandel por ter assumido a minha orientação, após o falecimento do Prof. Dr. Paulo Sodero Martins.
- À Dra. Teresa Carvalho, CENA/USP, pelos primeiros ensinamentos de eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida.
- Aos membros do laboratório de microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial a Prof. Dra. Aline Pizzirani-Kleiner, Wellington Araújo e Walter Macheroni pelo apoio no desenvolvimento do protocolo da técnica de isoenzimas em gel de poliacrilamida em gradiente e prazerosa convivência.
- Ao Prof. Dr. Ricardo Azevedo e Dra. Salete Gaziola, pelo empréstimo de equipamentos que em muito agilizaram o desenvolvimento deste trabalho.
- À Dra. Teresa Valle, Setor de Raízes e Tubérculos - IAC, pelas importantes discussões sobre a origem geográfica e reprodução de mandioca.
- Ao Prof. Dr. Akihiko Ando pela amizade, e forma alegre, muito contagiante, de ser.
- À Dra. Maria Inez Faraldo, Centro de Raízes e Amidos Tropicais – CERAT, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.
- Ao amigo Alexandre Sebben, do Departamento de Essências Florestais – ESALQ/USP pela valiosa contribuição na análise estatística.

- Aos amigos da Colônia Paraense em Piracicaba-SP: Marcos André, Dênmore Araújo, Cláudia Lira, Betânia Cabral, Joelson Araújo, Michele Xavier, Rosângela Pena, Oriel Lemos, Rosinele Lemos e Michele Lemos.

- Aos meus tios Luís Oliveira e Luzia Oliveira e às minhas primas Anne Oliveira e Dakilene Oliveira pelos momentos agradáveis no Rio de Janeiro e por compensar um pouco a falta que sinto da minha família

- Aos Amigos do Movimento Jovem do Centro Comunitário "Jesus Maria José" pelo grande incentivo ao longo destes 13 anos de valorosa amizade.

- Aos colegas do laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada – LEEGA, o meu muito obrigado pela oportunidade de convívio.

- Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial a Ronaldo Rabello, Cláudio Segatelli, Léia de Oliveira, Adriana Ribeiro e Silvana de Oliveira, pela amizade e facilidades concedidas durante o curso.

- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial a Rogério Melo, Wellington Araújo, André Oliveira, Carlos Aguillar e Angela Lopes pelo constante apoio, principalmente, nas horas mais difíceis desta caminhada.

- À Prof. Dra. Elizabeth Veasey pela colaboração na correção desta Tese.

- A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado, certamente sem ajuda de vocês um trabalho com estas proporções não seria possível de ser realizado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Taxonomia.....	5
2.2 Aspectos citogenéticos.....	5
2.3 Origem e distribuição geográfica	6
2.4 Caracterização botânica.....	8
2.5 Fenologia da floração e frutificação.....	11
2.6 Biologia floral.....	13
2.6.1 Abertura da flor	13
2.6.2 Receptibilidade do estigma.....	14
2.7 Estudos palinológicos, viabilidade dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico	14
2.8 Produção e germinação das sementes de mandioca.....	15
2.9 Sistema reprodutivo, fluxo gênico e polinizadores da flor da mandioca.....	15
2.10 Dinâmica evolutiva da mandioca e Etnovariedades.....	16
2.11 Análise do sistema reprodutivo	23
2.11.1 Determinação do sistema reprodutivo por meio de marcadores genéticos morfológicos	24
2.11.2 Determinação do sistema reprodutivo por meio de marcadores isoenzimáticos.....	26
2.12 Determinação do fluxo gênico dentro de população.....	29
2.13 Paternidade em frutos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Material.....	35
3.1.1 Descrição das etnovariedades de mandioca analisadas	35
3.1.2 Obtenção das progênes de polinização livre.....	38
3.2 Métodos.....	41
3.2.1 Análise isoenzimática	41
3.2.1.1 Extração das enzimas	41
3.2.1.2 Preparação dos géis de poliacrilanida	42
3.2.1.3 Preparação das amostras, “carregamento do gel” e eletroforese	47

3.2.1.4 Revelação histoquímica das enzimas	48
3.2.1.5 Documentação e interpretação dos géis	49
3.2.2 Determinação do sistema reprodutivo.....	51
3.2.3 Quantificação da movimentação do pólen.....	53
3.2.4 Determinação da paternidade das sementes de um fruto.....	58
 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 59
4.1 Obtenção das progênes.....	59
4.2 Avaliação isoenzimática	62
4.3 Determinação do sistema reprodutivo.....	78
4.3.1 Aderência dos dados ao modelo multilocos	78
4.3.2 Taxa de cruzamento.....	80
4.4 Quantificação da movimentação do pólen	87
4.4.1 Diversidade genética na roça experimental	87
4.4.2 Distância do parental masculino.....	89
4.5. Determinação da paternidade dentro dos frutos	97
 5. CONCLUSÕES	 101
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 103
 Apêndice 1: Solução de extração	 121
Apêndice 2: Soluções estoque para preparação de gel de poliacrilamida	122
Apêndice 3: Protocolo de revelação histoquímica das enzimas	124
Apêndice 4: Dados binários usados nas análise de divergência genética	129

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo de dinâmica evolutiva de mandioca proposto por Martins, ampliado a partir de Cury (1993)..... 20
- Figura 2: Disposição das etnovariedades de mandioca na roça experimental. Piracicaba, ESALQ/USP, 1996..... 39
- Figura 3. Obtenção das progênes de mandioca de polinização livre. a: fase de germinação das sementes e b: plantas jovens originadas a partir das sementes de um fruto com três sementes. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997..... 40
- Figura 4. Marcador de gradiente e construção de um gel em gradiente linear de concentração de acrilamida. 45
- Figura 5. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima citosol aminopeptidase (CAP), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de *M. esculenta*, com seus respectivos locos (A e B), alelos (A1, A2 e B) e valores de referência..... 66
- Figura 6. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima glucose 6-fosfato isomerase (GPI), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de *M. esculenta*, com o loco analisado (A), alelos (A1 e A2) e valores de referência..... 68
- Figura 7. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima Xiquimato desidrogenase (SKDH), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de *M. esculenta*, com seu loco (A), alelos (A1, A2, A3 e A4) e valores de referência..... 70
- Figura 8. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), analisados em folhas recém-expandidas de 14 etnovariedades de *M. esculenta*, com seu loco (A), alelos (A1 e A3) e valores de referência..... 72
- Figura 9. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima Aspartato Aminotransferase (AAT), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de *M. esculenta*, com seus respectivos locos (A e B), alelos (A1, A2, B1 e B2) e

valores de referência.....	73
Figura 10. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima glutamato desidrogenase (GTDH), analisados em folhas recém-expandidas de 14 etnovariedades de <i>M. esculenta</i> , com seu loco (A), alelos (A1, A2 e A3) e valores de referência...	75
Figura 11. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima Fosfatase Ácida (ACP), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de <i>M. esculenta</i> , com o locos (A), alelos (A1 e A2) e valores de referência.....	77
Figura 12. Dicogamia protogínica em mandioca. a: flores femininas abertas e flores masculinas em fase de botão floral; b: flores masculinas desenvolvidas e flores femininas em estágio de fruto em desenvolvimento. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.....	84
Figura 13: Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 56 etnovariedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>), fundamentado na matriz de similaridade genética obtida pelo coeficiente de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M. A.	88
Figura 14: Relação entre o número de indivíduos doadores de pólen e a distância de dispersão em relação ao centro de recebimento dos grãos de pólen em oito genótipos de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das etnovariedades de <i>M. esculenta</i> analisadas, listadas segundo o número de identificação da coleção ESALQ/USP, local de coleta (comunidade/roça), nome local, uso e origem do material. Piracicaba, ESALQ/USP, 1996.....	36
Tabela 2: Número de frutos (NF), número de sementes (NS), número de sementes (NS) germinadas de oito etnovariedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz). Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.....	60
Tabela 3: Teste de χ^2 para aderência dos locos ao modelo multilocos, estimativas das frequências alélicas, desvios-padrão dos óvulos e grãos de pólen contribuintes para o conjunto gênico de <i>M. esculenta</i> Crantz. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.....	79
Tabela 4: Estimativas da taxa de cruzamento multilocos (t_m) populacional, taxa de cruzamento uniloco (t_s), número de progênies analisadas, número de indivíduos analisados para os locos isoenzimáticos estudados em <i>M. esculenta</i> Crantz. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.....	82
Tabela 5: Estimativas da taxa de cruzamento multilocos (t_m) e número de indivíduos estudados para as oito matrizes de <i>M. esculenta</i> Crantz estudadas. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.....	86
Tabela 6: Distância do parental masculino e número de frutos analisadas em oito genótipos de <i>M. esculenta</i> Crantz. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.....	91
Tabela 7: Grau de Parentesco em plantas resultantes de frutos com duas e três sementes de <i>M. esculenta</i> Crantz. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.....	98

SISTEMA REPRODUTIVO, FLUXO GÊNICO E PATERNIDADE EM ROÇA DE ETNOVARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

Autor: Rainério Meireles da Silva

Orientador: Prof. Dr. Gerhard Bandel

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma importante cultura tropical, cujo sistema reprodutivo é pouco conhecido. O modelo de dinâmica evolutiva para a mandioca pressupõe recombinação genética por meio de polinização cruzada dentro da roça como fonte amplificadora da diversidade genética. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ocorrência de cruzamentos em roça formada por 56 etnovariedades de mandioca coletadas em roças de caboclos (subsistência) e de índios da Região Amazônica e do Estado de São Paulo. Procurou-se determinar o sistema reprodutivo das etnovariedades, a existência de cruzamentos entre etnovariedades de regiões geográficas diferentes, a distância de movimentação dos alelos dentro da roça, via grãos de pólen, e a paternidade das plantas oriundas de sementes da roça experimental. Utilizou-se, para tanto, marcadores isoenzimáticos, revelados a partir de eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida em gradiente. Foram avaliados oito sistemas isoenzimáticos e identificados dez locos polimórficos. A

taxa de cruzamento foi determinada pelo modelo multilocos e a determinação da paternidade foi realizada utilizando o programa PATER. Em mandioca, os frutos geralmente têm duas ou três sementes, entretanto, sementes originadas de frutos com uma só semente têm maior probabilidade de germinar. A taxa de cruzamento multilocos (t_m) estimada foi de 0,915, revelando que 91,5% das plantas foram geradas por cruzamentos, e 8,5% por autofertilização. O alto valor encontrado para a taxa de cruzamento indica que as etnovariedades avaliadas apresentam a forma alógama para o sistema reprodutivo. A distância do parental masculino, ou seja, o deslocamento do grão de pólen, variou de 0 (autofertilização) a 14,4 m, com média de 7,2 m; 88,9% das plantas oriundas de frutos com duas sementes eram meio-irmãs e 11,1% eram irmãs completas; nas plantas oriundas de frutos com três sementes, 81,8% eram meio-irmãs e 18,2% eram irmãs completas. Portanto, as plantas oriundas de frutos com duas e três sementes apresentam maior probabilidade de serem meio-irmãs. O programa PATER mostrou-se eficiente na determinação da paternidade das plantas de mandioca. Existe fluxo gênico efetivo, via grão de pólen, entre etnovariedades originadas de diferentes regiões geográficas; o fluxo gênico é característico de plantas polinizadas por abelhas, como ocorre na mandioca. Constatou-se, portanto, recombinação genética por meio de polinização cruzada dentro de roça de mandioca, conforme pressuposto no modelo de dinâmica evolutiva para a espécie.

BREEDING SYSTEM, GENE FLOW AND PATERNITY IN GARDENS OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz) LANDRACES

Author: Rainério Meireles da Silva

Adviser: Prof. Dr. Gerhard Bandel

SUMMARY

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important tropical crop, whose breeding system aspects are not very well known. The model of evolutionary dynamics for cassava presupposes genetic recombination by means of outcrossing within cassava gardens as an amplifying source of genetic diversity. The objective of this work was to verify crossings within a garden formed by 56 cassava landraces, collected in gardens of caboclos (subsistence) and Indians of the Amazon Region and the State of São Paulo. The breeding system of the landraces, the existence of crossings among landraces from different geographical regions, the distance of allele movement inside the garden, through pollen grains, and the paternity of the plants originating from seeds from the experimental garden, were evaluated. Isozyme markers were used revealed by acrylamide gel in gradient electrophoresis. Eight enzymatic systems were used and ten polymorphic loci were identified. The outcrossing multilocus rate was determined by the MLTR program and the paternity was accomplished

using the PATER program. In cassava, the fruits usually have two or three seeds, however, seeds originated from fruits with a single seed have a larger probability of germinating. Multilocos outcrossing rate (t_m) was 0.915, revealing that 91.5% of the plants were generated by outcrossing, and 8.5% by selfing. The high value found for the outcrossing rate indicates that the appraised landraces present allogamy as the breeding system. The distance of the masculine parental varied from 0 (selfing) to 14.42 m, with an average of 7.17 m; 88.89% of the plants originating from fruits with two seeds were half-sibs and 11.11% were full-sibs; in plants originating from fruits with three seeds, 81.81% were half-sibs and 18.19% were full-sibs. Therefore, plants originating from fruits with two and three seeds had greater probability of being half-sibs. The computer program (PATER) was considered efficient in the determination of the paternity of cassava plants; effective gene flow exists, through pollen grain, among originated landraces of different geographical regions; the gene flow is characteristic of plants pollinated by bees as it happens in cassava. It was verified, therefore, that genetic recombination occurs through outcrossing within gardens of cassava, according to the presupposition in the model of evolutionary dynamics for this species.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pertencente a família Euphorbiaceae, é uma importante cultura tropical, constituindo-se na principal fonte de calorias para mais de 500 milhões de pessoas na África e América do Sul (FAO, 1991).

Os termos *landraces*, *folk variety* ou *primitive variety* têm sido definidos como populações ecológica ou geograficamente distintas originadas a partir da seleção local realizada por agricultores (Brown, 1978). No entanto, para maior uniformização terminológica, neste trabalho será utilizado o termo etnovarietade, sugerido por Martins¹.

A reprodução sexuada das espécies amplifica a variabilidade das populações por meio da recombinação genética, formando novas combinações gênicas com potencial adaptativo e/ou agrônômico maior que os parentais que lhe deram origem. A mandioca, ao longo do tempo, vem sendo propagada vegetativamente pela interferência humana, contudo manteve a reprodução sexuada ativa, promovendo a amplificação da variabilidade genética e possibilitando aos melhoristas selecionar os genótipos de maior importância agrônômica. Portanto, o conhecimento dos aspectos reprodutivos da mandioca

¹MARTINS, P.S. (ESALQ/USP. Departamento de Genética, Piracicaba). Comunicação pessoal, 1994.

é um fator de grande importância para a compreensão do modelo de dispersão gênica via grão de pólen.

O termo sistema reprodutivo num sentido restrito, refere-se à forma como os indivíduos se reproduzem. Em sentido amplo, refere-se a todos os aspectos da reprodução em plantas, que afetam a contribuição genética para a próxima geração, dentro de uma espécie.

O sistema reprodutivo determina o modelo de transmissão genética e afeta a organização da variabilidade genética da população. A endogamia restringe a heterozigosidade e migração realizada pelo fluxo gênico, reduz a variação dentro da população e aumenta a variabilidade entre as populações. Em contraste, a exogamia promove o fluxo gênico, diminui a variabilidade entre as populações, reduz a probabilidade de diferenciação da população (Kearns & Inouye, 1993).

Segundo Brown (1990), as plantas transmitem suas características genéticas aos descendentes de cinco formas: 1) predominantemente por autofertilização (autogamia); 2) predominantemente por fertilização cruzada (alogamia); 3) por combinação de autogamia e alogamia (mista); 4) por apomixia parcial e 5) por autofertilização parcial dos gametófitos (como ocorre em samambaia e na reprodução de dihaplóides).

O conhecimento do sistema reprodutivo utilizado pela espécie determina o método de melhoramento mais adequado a ser empregado. Brown et al. (1985), enfatizam a importância de se conhecer o modo de reprodução das plantas para auxiliar no manejo das culturas, florestas e pomares, e potencial

aplicação no manejo de espécies silvestres para conservação de sua variabilidade genética.

O conhecimento do fluxo gênico, via grão de pólen, numa população (roça) fornece informações de como distribuir as plantas nos campos de cruzamentos para maximização da polinização.

A determinação da paternidade das sementes de um fruto, ou seja, a avaliação do grau de parentesco das plantas originadas a partir das sementes de um fruto, indica a forma como a progênie deverá ser manipulada em programas de melhoramento genético, pois as progênies de irmãos-completos, formadas por plantas que têm o mesmo parental feminino e masculino, receberão tratamento diferenciado daquelas progênies de meio-irmãos, as quais têm somente um parental em comum.

O modelo de dinâmica evolutiva para a mandioca proposto por Cury (1993) e ampliado pelo Professor Paulo Sodero Martins da ESALQ/USP, pressupõe recombinação genética por meio de polinização cruzada dentro da roça como fonte amplificadora da diversidade genética. Em decorrência dessa possibilidade, os autores classificaram o manejo das roças na agricultura autóctone como conservação *in situ*, pois existe a manutenção dos processos de geração e ampliação da variabilidade genética.

Embora a mandioca seja uma espécie que apresenta grande potencial econômico e constitui-se num bom exemplo para estudos de ecologia evolucionária e domesticação nos trópicos, pouco se conhece a respeito do sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade da espécie. Os objetivos do

presente trabalho foram: a) determinar o sistema reprodutivo das etnovariedades estudadas; b) averiguar a existência de cruzamentos entre etnovariedades de várias partes da Amazônia brasileira e do Estado de São Paulo numa roça experimental em Piracicaba-SP; c) quantificar a movimentação dos grãos de pólen dentro da roça experimental; e d) determinar a paternidade das plantas oriundas de sementes produzidas na roça experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia

Segundo a classificação botânica de Engler, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pertence a divisão Anthophyta; subdivisão Angiospermae; classe das Dicotyledoneae; subclasse Arquiclamydeae, a qual se diferencia pelo perianto pouco evoluído; ordem Euphorbiales; família Euphorbiaceae; tribo Manihoteae; gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz.

2.2 Aspectos citogenéticos

Segundo Darlington & Wylie (1955); Graner (1935) e Soontornchainaksaeng & Chaiyasut (1999), a mandioca apresenta meiose regular, com as células somáticas apresentando $2n=36$ cromossomos, sendo os cromossomos muito pequenos.

Perry (1943) e Umanah & Hartmann (1973) classificaram a espécie como alopoliplóide com número básico de cromossomos $x=9$. Segundo Magoon et al. (1969), a mandioca é um alotetraplóide originado a partir do cruzamento entre

duas espécies muito próximas geneticamente. Os indícios citogenéticos indicam que a mandioca ou seu ancestral era alopoliplóide; possivelmente a espécie sofreu diploidização e atualmente é consenso que a mandioca é diplóide.

Soontornchainaksaeng & Chaiyasut (1999) realizaram avaliação cromossômica em 36 espécies de 18 gêneros da família Euphorbiaceae, constatando grande diversidade no número de cromossomos dentro e entre os gêneros, com variação de $2n=16$ a 104. A maior parte das espécies apresentam cromossomos muito pequenos (1,0 a 3,33 μm).

2.3 Origem e distribuição geográfica

A mandioca é uma espécie cujo centro de origem ainda não foi estabelecido, e pode apresentar mais de um centro de origem; no entanto é consenso que é originada das Américas.

Para Rogers (1963), o gênero *Manihot* tem dois centros de origem: o primeiro, compreendendo as áreas mais secas do Oeste e Sul do México e porções da Guatemala e o segundo as áreas secas da América do Sul como porções do Nordeste do Brasil. O autor relata que as cultivares com baixa concentração de ácido cianídrico são mais largamente distribuídas do que as cultivares que apresentam alta concentração desse ácido.

Renvoize (1973) considera a possibilidade da mandioca doce (mandioca que apresenta baixo teor de ácido cianídrico, conhecida na Região Norte como

macaxeira e Aipin na Região Nordeste) ter sido primeiramente domesticada na América Central, enquanto o tipo amargo (mandioca que apresenta alto teor de ácido cianídrico, conhecida na Região Norte como maniva) foi cultivado primeiro no Norte da América do Sul e a subsequente intercomunicação dos índios americanos promoveu a difusão dos dois tipos. O autor, também relata que embora existam muitas espécies do gênero *Manihot* encontradas no Brasil, parece improvável que o tipo amargo tenha sido domesticado primeiramente aqui.

Schmidt (1951), baseado em estudos sobre a migração indígena desde a América do Sul até as Antilhas, principalmente dos grupos Tupi e Guarani, sugere a possibilidade da domesticação da mandioca ter ocorrido na Amazônia brasileira.

Baseado no conceito de Vavilov sobre os centros de diversidade, na hipótese de idade e área de Wills, na teoria de introgressão de Harlan e na história dos grupos indígenas da época pré-colombiana, Nassar (1976) concluiu que o Norte da Amazônia é o primeiro local de domesticação da mandioca e Goiás o centro de diversificação das espécies do gênero *Manihot* como um “grupo biológico”.

Existem três questões importantes a serem estudadas em relação a origem da mandioca: a origem botânica, ou seja, a espécie silvestre da qual a mandioca descende; a origem geográfica, a área onde o progenitor evoluiu no passado geológico; e a origem agrícola, a área de cultivo inicial do ancestral silvestre realizado pelos Amerindos de acordo com Allem.¹

¹ ALLEM, A.C. (CENARGEN - EMBRAPA, Brasília, DF). Comunicação pessoal, 2000.

Allem (1994), avaliando características morfológicas e geográficas, constatou que a espécie *Manihot flabellifolia* é o ancestral da mandioca cultivada. Olsen & Schaal (1999), trabalhando com marcadores moleculares confirmaram essa pressuposição.

Segundo Allem (1997), a mandioca foi originada na área que compreende os Estados de Goiás, Rondônia e Mato Grosso; entretanto, os estudos de Olsen & Schaal (1999) confirmam a área pertencente aos Estados de Rondônia e Mato Grosso como sendo o local de origem da mandioca.

A mandioca foi introduzida na África e Ásia no século XVI, por portugueses e espanhóis; entretanto, sua importância na África Ocidental começou no século XIX, e sua adoção geral ocorreu somente no século XX (Allem & Goedert, 1991). Atualmente, a mandioca é cultivada em todas as áreas tropicais do mundo.

2.4 Caracterização botânica

Segundo Domínguez et al. (1984) e Graner (1942), a mandioca é uma planta perene e arbustiva, cuja altura varia de 1 a 5 m, sendo mais comum encontrar plantas de 1 a 3 m. As características básicas da mandioca são:

Ramificação: simpodial, onde caule ou caules primários se ramificam em dicotomia, tricotomia e tetracotomia, originando ramas secundárias as quais originam ramas terciárias, que por sua vez originam outras ramificações

sucessivas. As ramificações que induzem o florescimento foram denominadas de ramificações reprodutoras.

Caule: cilíndrico quando maduro, diâmetro variando de 2 a 6 cm; a coloração básica é o prateado ou cinzento, roxo e amarelo; é formado por nós e entrenós.

Folhas: simples, compostas pela lâmina foliar e pecíolo; lâmina foliar palmada e lobulada; coloração roxa, verde escuro e verde claro; o número de lóbulos varia de 3 a 9 conforme a cultivar ou mesmo dentro da planta; os lóbulos podem ser classificados, segundo a forma, em: linear ou reto, ovalado, estrangulado, elíptico, lanceolado e oblongo-lanceolado; a coloração das nervuras varia de verde a roxa; o pecíolo apresenta o comprimento variando de 9 a 20 cm, delgado, pigmentação variando de verde (ausência de pigmentação) a roxa (pigmentação intensa).

Estipulas: em número de duas, com aproximadamente 0,5 a 1 cm de comprimento, localizadas ao redor da folha, permanecendo ou não quando às folhas se desenvolvem.

Inflorescências: são formadas por flores masculinas e femininas, sendo estas últimas comumente localizadas na parte basal. As inflorescências são constituídas por panículas e ráceros, podendo ser classificadas conforme a sua constituição em: 1) grupo formado exclusivamente por ráceros; 2) grupo de ráceros que rodeiam uma panícula central; 3) grupo de panículas que rodeiam uma panícula central; e 4) grupo constituído por ráceros e panículas que rodeiam uma panícula central.

As flores masculinas e femininas não apresentam cálice ou corola, têm uma estrutura indefinida denominada de perianto, composta de cinco tépalos de coloração amarela, avermelhada ou roxa, os quais nas flores femininas encontram-se separados, o que não acontece nas flores masculinas. A flor feminina apresenta aproximadamente 15 mm de comprimento entre as extremidades dos tépalos, a flor masculina tem aproximadamente a metade do tamanho da flor feminina, apresenta o pedicelo reto, curto e fino, enquanto o pedicelo da flor feminina é recurvado, longo e de maior diâmetro. São encontradas seis flores femininas e 50 masculinas por inflorescência. Crepaldi (1987) constatou média de 72,17 flores masculinas e média de 6,4 flores femininas nas cultivares Branca de Santa Catarina e Taquari.

No interior da flor masculina encontra-se o disco basal, dividido em 10 lóbulos. No centro do disco encontra-se um resquício de ovário. No espaço entre os lóbulos do disco basal surgem os dois conjuntos de estames, sendo cinco mais externos, separados e mais compridos que os internos e ao unir-se formam o conjunto de anteras. As anteras apresentam a forma alongada e encontram-se inclinadas para o interior da flor.

No interior da flor feminina encontra-se um disco menos lobulado que o encontrado na flor masculina, o qual serve de suporte para o ovário. Em algumas variedades encontram-se estaminódios provenientes dos lóbulos glandulares do disco basal. O ovário é supero, dividido em três lóculos, cada um contendo um óvulo; sobre o ovário encontra-se um estilete muito pequeno, o qual sustenta o estigma composto por três lóbulos ondulados e carnosos.

Fruto: é uma cápsula deiscente, trilocular de forma ovóide ou globular de 1 a 1,5 cm de diâmetro, com 6 arestas longitudinais, estreitas e proeminentes. Em corte transversal observa-se o endocarpo lenhoso, o qual se abre bruscamente, quando o fruto está maduro, para liberar às sementes.

Semente: apresenta a forma ovóide-elipsóide e mede, aproximadamente, 9 mm de comprimento, 5 mm de largura e 3,5 mm de espessura (Ogburia & Adachi, 1995); testa, parte mais externa da semente, lisa, apresentando coloração escura manchado com cinza. Na parte superior encontra-se, especialmente na semente jovem, a carúncula, estrutura que se perde quando a semente cai no solo. Na extremidade oposta à carúncula existe uma pequena cavidade basal.

Endosperma: situado logo após a testa, é constituído por células parenquimatosas poliédricas. É o tecido formador dos cotilédones e tem como função proteger e nutrir o embrião.

Embrião: é formado pelas folhas cotiledonares, a plúmula, o hipocótilo e a radícula. As folhas cotiledonares ocupam quase todo o interior da semente; apresenta coloração branca e são elípticas e carnosas.

2.5 Fenologia da floração e frutificação

O estudo de fenologia de uma planta, concentra-se no acompanhamento dos fenômenos de floração, frutificação e mudança foliar. Na maioria das espécies, o ambiente regula os fenômenos fenológicos, o que leva os

indivíduos a florescerem sincronicamente, fazendo com que a reprodução sexuada seja realizada sob condições externas favoráveis.

A floração da mandioca sempre é acompanhada por uma ramificação do caule. As variedades que não ramificam não florescem (Domínguez et al., 1984).

Rajendran (1984) observou que o híbrido resultante do cruzamento entre as linhagens CI 699 e CI 572, cultivado em Trivandrum, Índia, ramificou e floresceu aos três meses de idade. Aziz (1984), estudando a influência da altitude na floração da mandioca, na Malásia, constatou que as variedades *Black Twing*, *Green Twing*, *C5*, *Medan*, *Jurai* e *Betacui*, as quais apresentavam floração tardia em terras baixas, floresceram e frutificaram mais cedo quando cultivadas a 1000 m de altitude.

Graner (1942) constatou florescimento na variedade Vassourinha Paulista, seis meses após o plantio. Crepaldi (1987) constatou período de florescimento muito semelhante entre as cultivares avaliadas. A Branca de Santa Catarina apresentou florescimento entre dezembro e janeiro, e terminou entre maio e junho; enquanto a cultivar Taquari, por sua vez, iniciou o florescimento em janeiro e findou entre maio e junho.

2.6 Biologia floral

A biologia floral está inserida, num amplo contexto, dentro da biologia reprodutiva, abrangendo todos os eventos que ocorrem na flor, desde a formação das gemas florais até a fecundação.

2.6.1 Abertura da flor

Segundo Capinpin & Bruce (1955) e Chandraratna & Nanayakkara (1948), a abertura das flores da mandioca está concentrada entre 12h e 13h30min. Crepaldi (1987) estudando o comportamento da floração das variedades Branca de Santa Catarina e Taquari, em Campinas, Brasil, constatou que a abertura das flores ocorreu em torno de 12 horas e o fechamento entre 15 e 16 horas. A autora, também, observou que as flores femininas iniciam primeiro o fechamento.

Jos et al. (1990) estudando a abertura das flores de clones cultivados em Trivandrum, Índia, constataram que alguns clones apresentam abertura das flores antes das onze horas, porém o horário de maior intensidade de abertura da flor dos clones foi às 12 horas.

As flores femininas abrem, aproximadamente, duas semanas antes das flores masculinas, demonstrando portanto que a espécie é dicógama protogínica (Capinpin & Bruce, 1955; Graner, 1942 e Hershey & Amaya, 1984).

2.6.2 Receptibilidade do estigma

Jos et al. (1990) estudaram a duração da receptibilidade do estigma e o melhor horário para a polinização artificial, através de polinizações controladas nos clones intercompatíveis OP-4 e OP-7 cultivados em Trivandrum, Índia, e constataram que a produção de sementes foi maior quando as polinizações foram realizadas no intervalo de seis da manhã até às 14 horas, portanto, seis horas antes e duas horas após a abertura das flores.

2.7 Estudos palinológicos, viabilidade dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico.

Singh et al. (1968) classificaram os grãos de pólen da mandioca com base no diâmetro em: pequeno (<90 microns), médio (90 a 150 microns) e grande (> 150 microns). Segundo Ybert (1975), o grão de pólen da mandioca é esférico, periporoso, e têm grandes poros. O autor separou as partes constituintes em: exina, indexina, columelas e tectum.

Graner (1942) estimou que a flor masculina produzia cerca de 1600 grãos de pólen, entretanto, Crepaldi (1987) constatou menor número quando avaliou as anteras de botões florais das cultivares Branca de Santa Catarina e Taquari.

Segundo Jos et al. (1990), três horas após a polinização ocorreu a germinação do grão de pólen, com nove horas o tubo polínico atravessou a

base do estilete e com doze horas atingiu o óvulo. Os clones de mandioca estudados apresentavam mais de 90% dos grãos de pólen férteis.

2.8 Produção e germinação das sementes de mandioca

Ogburia & Adachi (1995) classificaram as sementes de mandioca em: sementes verdadeiras, que são aquelas que submergem quando colocadas em água (densidade >1), e pseudo-sementes, as que flutuam (densidade <1). O fenótipo externo dos dois tipos de sementes é igual; entretanto, as pseudo-sementes apresentam endosperma e embrião mal formados ou inexistentes. O desenvolvimento anormal do endosperma e embrião é decorrente de divisões mitóticas irregulares.

Segundo Chandraratna e Nanayakkara (1948), a taxa de germinação das sementes de mandioca é baixa e disforme, constituindo-se no maior problema para obtenção de híbridos. Entretanto, autores como Fukuda & Cerqueira (1986); Monteiro et al. (1984); Pinheiro (1985); e Valle (1990), obtiveram taxa de germinação variando de 70% a 90%.

2.9 Sistema reprodutivo, fluxo gênico e polinizadores da flor da mandioca

Conforme Kawano et al. (1978), a mandioca é uma espécie monóica, apresenta flores masculinas e femininas numa mesma planta e não apresenta barreiras genéticas ou fisiológicas que impeçam a autofertilização. Portanto, a

autofertilização, assim como a fertilização cruzada ocorre naturalmente. Os autores constataram também que a produtividade das cultivares autopolinizadas foi a metade do rendimento apresentado pelos parentais que lhe deram origem e o grau de depressão endogâmica variou consideravelmente entre os genótipos estudados.

Pereira et al. (1978) determinaram a taxa de cruzamento na cultivar Branca de Santa Catarina por meio de marcadores morfológicos, lóbulo foliar largo (vv) e cobertura da raiz branca (mm). Os resultados demonstraram que a polinização cruzada foi de 63% e 100%, respectivamente, para os dois caracteres.

Kawano et al. (1978) utilizaram a coloração da nervura da folha como marcador genético para distinguir progênies de fertilização cruzada de autofertilização e constataram que a distância de 30 metros é suficiente para assegurar o isolamento genético das populações.

2.10 Dinâmica evolutiva da mandioca e etnovariedades

O Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo em Piracicaba, vem desde a sua fundação em 1936 desenvolvendo trabalhos na área de evolução de plantas cultivadas, onde no início destacaram-se trabalhos com forte abordagem multidisciplinar principalmente na cultura do milho (Martins, 1996).

Como consequência da forte tradição na área, a partir do início da década de 90, o Laboratório de Genética Ecológica, atualmente denominado de Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada do Departamento de Genética da ESALQ, iniciou nova etapa em seu programa de pesquisa na evolução de plantas cultivadas, enfatizando o estudo do processo da domesticação de plantas com propagação vegetativa nas terras baixas sul americanas e suas conseqüências, também pautado em forte abordagem multidisciplinar (Cury, 1998 e Martins, 1996).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) foi escolhida como modelo para as espécies que apresentam propagação vegetativa, cujo objeto da domesticação envolve órgãos de reserva que desenvolvem-se no solo (Cury, 1993).

A mandioca foi escolhida também por ser cultivada antes do descobrimento das Américas, sendo a principal fonte de alimento energético cultivado pela maioria dos índios. Ainda hoje é muito importante para populações que vivem da agricultura de subsistência na África e na América Latina, apresentando grande importância para a agricultura atual como fonte de alimento energético e de amido para indústria de transformação.

Do ponto de vista agrônomo, biológico e experimental a mandioca é uma espécie muito interessante, pois manteve a rusticidade, não perdendo a capacidade de se reproduzir sexualmente. É perene e pode ser mantida em coleções vivas; faz parte de um grande gênero com quase uma centena de espécies, sendo que muitas delas compartilham do mesmo conjunto gênico da

espécie domesticada; e o mais interessante, se considerarmos o processo da domesticação como contínuo, a domesticação da mandioca continua a ocorrer em muitas roças que mantêm o sistema tradicional autóctone de agricultura (Cury, 1998).

Atualmente, a ESALQ/USP conta com uma coleção de mais de 400 etnovariedades brasileiras de mandioca, agrupadas por roça e localidade de coleta, sendo que para maior parte da coleção as informações etnobiológicas foram preservadas. A referida coleção é a única coleção a apresentar materiais do baixo rio Negro (AM), rio Branco (RR) e baixo rio Solimões (AM) (Fukuda et al., 1996). A Região do rio Negro é muito importante pois apresenta alta concentração de tribos indígenas cuja ênfase na agricultura sempre foi o cultivo da mandioca (Ribeiro, 1995).

Cury (1993), estabeleceu princípios que servem como base para o estabelecimento do modelo de dinâmica evolutiva da mandioca proposto por Martins (1996). O modelo utiliza a roça de mandioca como a unidade evolutiva, pois é nessa população que ocorrem os processos evolutivos. O modelo leva em conta o fato da mandioca, apesar de ser propagada assexuadamente pelos agricultores, possuir sistema reprodutivo sexual ativo, capaz de gerar novos recombinantes, os quais aparecem na roça pela germinação espontânea das sementes. Esse material é introduzido no conjunto gênico promovendo amplificação da variabilidade genética da população (roça), como resultado de cruzamentos entre diferentes clones, hibridações interespecíficas e autofecundação de indivíduos heterozigotos, sendo esse conjunto de novos

genótipos, assim como os genótipos já existentes, objeto de seleção natural, seleção perceptiva e seleção consciente pelos agricultores (Figura 1). Dessa forma, os agricultores mantêm o conjunto original de etnovariedades através da reprodução clonal e obtêm novos genótipos pelo processo sexual.

Portanto, a reprodução sexual dentro das roças, as quais geralmente são compostas por várias etnovariedades, é parte essencial para o estabelecimento do modelo.

Cury (1993) estabeleceu princípios que determinaram o modelo. Faraldo (1994) constatou existência de grande variabilidade genética entre as populações de mandioca do Litoral Sul do Estado de São Paulo. Sambatti (1998) constatou associação entre fertilidade e diversidade genética, onde o genótipo mais adaptado tende a predominar nas roças alteradas menos férteis.

O termo *Landrace* ou Etnovariedade, como recurso genético, foi discutido pela primeira vez no “Internationaler Land- und Forstwirtschaftlicher (Agricultura e Silvicultura) Congress”, realizado em Viena em 1890. Os participantes E. von Proskowetz and F. Schindler propuseram discutir a conservação das *landraces*; no entanto, o assunto não foi levado em consideração. Entretanto, 37 anos depois, durante o Congresso Internacional Agrícola, realizado em Roma em 1927, organizado pelo Instituto Internacional Agrícola (o antecessor da FAO), a conservação das *landraces* foi extensivamente discutida (Zeven, 1998). Na Austria, foi iniciado um programa de conservação que funcionou apenas por alguns anos (Zeven, 1996). Em 1936, Harlan & Martini defenderam a conservação das *landraces* como recursos genéticos na América do Norte e

Figura 1. Modelo de dinâmica evolutiva de mandioca proposto por Martins, ampliado a partir de Cury (1993).

desde 1960 desenvolvem o Programa Internacional Biológico (Worthington, 1975).

Desde o final do século XIX, grande número de genótipos de vegetais têm sido coletados, armazenados e mantidos em banco de genes dos EUA e GIS (formado na USSR). Na Rússia, um grande número de pesquisadores sob a liderança de N.I. Vavilov coletaram muitas plantas. Nos dois países foram formados grandes bancos de genes. Ao mesmo tempo na Alemanha, foi iniciado o banco de genes em escala mundial (Lehmann, 1981).

Em alguns países, o melhoramento intensivo de diversas culturas foram iniciados há 150 anos. Certamente, por mais de 140 anos as *landraces* têm competido com as cultivares sob condições ambientais melhoradas. Contudo, nem todas as culturas foram melhoradas pelos métodos de melhoramento convencional. Atualmente, em países com programas de melhoramento bem estabelecidos ainda são encontradas *landraces* em algumas culturas secundárias. Um exemplo é a *landrace* trevo branco, a qual foi registrada na lista de Dutch de Variedades de Cultura Agrícola de 1979 (Zeven, 1991). O mesmo é verdadeiro para muitos genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), ainda cultivados na Nova Zelândia (Zeven, 1997).

Mayr (1934 e 1937), classificou as *landraces* em: autóctone, que é aquela cultivada por mais de um século numa determinada região; autoctógeno, que é aquela derivada de um novo genótipo (mutante espontâneo ou cruzamento natural), originado de uma *landrace* autóctone; alóctone, que é aquela *landrace* autóctone introduzida em outra região que adaptou-se muito

bem às condições ambientais; aloctógeno, que é aquela cultivada por longo período numa região não nativa e o tipo original ainda é reconhecido; e *landrace* melhorada, que é aquela derivada da “contaminação” com uma cultivar.

Zeven (1998), apresenta uma classificação de *landraces* mais resumida, como: autóctone, que é aquela cultivada por muito tempo num sistema agrícola regional, e alóctone, que é aquela *landrace* autóctone introduzida a partir de outra região. Em sua revisão sobre as definições de *landrace*, Zeven (1998), considera que a definição proposta por Mansholt (1909), é a que abrange mais características de uma *landrace*: “a *landrace* autóctone é uma variedade com alta capacidade para tolerar estresse biótico e abiótico resultando em alta estabilidade da produção e nível intermediário de produtividade sob baixa implementação do sistema agrícola”.

Brown (1978) define *Landrace*, *Folk variety*, *Traditional variety* ou *Primitive variety*, como uma população ecológica ou geograficamente distinta que se diferencia na composição genética dentro e entre outras populações, tendo sido resultante da seleção local realizada por agricultores-melhoristas.

Os termos citados anteriormente são traduzidos para o português como variedade local, tradução que o grupo de pesquisadores do laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada, do Departamento de Genética da ESALQ, não adota, por ser sinônimo dos já citados anteriormente. O termo *landrace* pela definição adotada, especifica a necessidade do homem como agente responsável pela seleção que deu origem às variedades, e por essa

razão o laboratório utiliza o termo etnovarietade, conforme sugestão do Prof. Paulo Sodero Martins.

O termo variedade local é muito amplo. Uma variedade local pode ser encontrada em estado silvestre e a sua formação não exige obrigatoriamente a pressão seletiva exercida pelo homem. O termo etnovarietade introduz o aspecto étnico-cultural, como passagem de germoplasma de geração a geração, troca de genótipo entre tribos indígenas, etc.

As etnovarietades são raças locais, as quais são cultivadas em roças, normalmente por pequenos produtores, que não sofreram o processo convencional de melhoramento, constituindo-se num reservatório de genes, o qual pode ser utilizado para formar novas variedades melhoradas ou até mesmo corrigir deficiências que variedades comerciais apresentam.

2.11 Análise do sistema reprodutivo

O sistema reprodutivo tem sido, tradicionalmente caracterizado pela taxa de cruzamento, a qual influencia o padrão da estrutura genética das populações. Atualmente, os estudos de determinação do sistema reprodutivo estão sendo, basicamente, realizados por meio de marcadores isoenzimáticos e moleculares; entretanto, os marcadores genéticos morfológicos foram e ainda estão sendo muito utilizados.

O conhecimento do sistema reprodutivo é útil em plantio e manejo das espécies que estão sendo conservadas, pois influencia a forma como as

coleções de germoplasma devem ser estabelecidas para conservação *ex situ* (Brown & Marshall, 1995) e quais as populações que devem receber prioridade para manutenção *in situ* (Frankel et al., 1995).

O sistema reprodutivo delimita a resposta para situações em que a reprodução sexual cruzada é limitada, tais como deriva (redução drástica do número de indivíduos em fase reprodutiva) causado por eventos de colonização ou fragmento de habitat (DeMauro, 1993). O nível de ploidia e modo de expressão do gene, também afetam a resposta evolucionária para tais situações. Por exemplo, o sistema reprodutivo em pequenas populações determina o grau de purificação da carga genética pela combinação de endogamia acoplada a seleção.

Como o sistema de cruzamento é afetado por fatores ambientais (Barrett & Eckert, 1990; Mitton, 1992), e é controlado geneticamente, está sujeito à seleção. Consequentemente, pode diferir entre as populações (Lyons & Antonovics, 1991), assim como dentro de populações, onde indivíduos podem exibir diferenças na quantidade de autofertilização ou fertilização cruzada, conforme constatado por Clegg & Epperson (1985).

2.11.1 Determinação do sistema reprodutivo por meio de marcadores genéticos morfológicos

O estudo do sistema reprodutivo avaliado por marcadores genéticos morfológicos teve seu auge nas décadas de 50 a 80. Os trabalhos eram

basicamente limitados para as espécies de interesse econômico, nas quais os marcadores morfológicos estavam disponíveis (Brown et al., 1989).

Os estudos basicamente apresentam a mesma metodologia; normalmente, utiliza-se um caráter monogênico, com herança genética dominante, cujo fenótipo das duas classes seja de fácil distinção. A planta com genótipo recessivo é rodeada por plantas que carregam o genótipo dominante para a característica analisada. Todos os descendentes da planta com o genótipo recessivo que apresentam o fenótipo governado pelo alelo recessivo são provenientes de autofertilização, os demais são de polinização cruzada. Essa forma de avaliação do sistema reprodutivo foi muito utilizada e atualmente ainda é usada, por apresentar baixo custo de implantação, fácil manipulação dos experimentos e análise dos dados.

Datta et al. (1982) determinaram a taxa de cruzamento em juta (*Corchorus olitorius* L.) utilizando-se do caráter pigmentação do caule como marcador genético, constando 3,92% de cruzamento.

Harding et al. (1974) utilizaram-se do caráter coloração da flor para determinar a taxa de cruzamento de *Lupinus nanus* e constataram variação de 0 a 100%, ou seja, desde completa polinização cruzada até completa autofertilização.

Pereira et al. (1978) utilizaram-se dos caracteres lóbulo foliar largo (vv) e cobertura da raiz branca (mm) para determinar a taxa de cruzamento da mandioca e constataram polinização cruzada de 63% e 100%, respectivamente.

Segundo Maiti et al. (1981), *Hibiscus cannabinus* L. é uma espécie autógena, que apresenta características florais para a atração de polinizadores. O sistema reprodutivo da espécie foi determinado utilizando-se do caráter formato da folha, sendo constatada taxa de cruzamento de 4,59%.

Kink (1990) utilizou-se do caráter coloração da semente para determinar a taxa de cruzamento em 36 linhagens endogâmicas de feijão fava (*Vicia faba* L.), constatando variação de 7% a 82%. O autor concluiu que para boa exploração da heterose, os melhoristas deveriam incluir linhagens com alta taxa de cruzamento nos programas de melhoramento.

Moresco (1999) utilizou-se do caráter que determina a presença de glândulas no caule do algodoeiro (*Gossypium spp.*) para determinar a taxa de cruzamento, constatando variação de 7,4% a 68,83%.

2.11.2 Determinação do sistema reprodutivo por meio de marcadores isoenzimáticos

A determinação do sistema reprodutivo por meio de marcadores isoenzimáticos possui três vantagens em relação à determinação por marcadores morfológicos: 1. As isoenzimas têm herança codominante; 2. muitos locos isoenzimáticos são altamente polimórficos na maioria das populações; e 3. as isoenzimas possivelmente não estão sujeitas a forças seletivas (Brown et al., 1989).

O padrão de segregação genético das isoenzimas nas progênes derivado de uma matriz comum (avaliação das progênes) promove informações a respeito da porcentagem de zigotos derivados de autofertilização (Clegg, 1980).

Os estudos utilizando as isoenzimas como marcadores têm constatado que plantas exibem grande variação na taxa de cruzamento. Algumas dessas variações resultam de características ecológicas de diferentes populações. Por exemplo, estudos de populações naturais e artificiais de plantas polinizadas por insetos têm demonstrado correlações entre a densidade de indivíduos em florescimento e taxa de cruzamento da população, relacionando o efeito da densidade de planta sobre movimentos de polinizadores (Karron et al., 1995).

As diferenças na mensuração da taxa de fertilização cruzada entre vários habitats demonstram a influência ambiental sobre a estrutura reprodutiva. Ellstrand et al. (1978), constataram em *Helianthus annuus* que a estimativa da taxa de cruzamento está correlacionada com a densidade das plantas. Em *Canavanillesia platinafolia* indivíduos isolados pela não floração de plantas próximas, apresentaram taxa elevada de autofertilização (Murawski & Hamrick, 1992).

Diversos pesquisadores têm utilizado o padrão de segregação isoenzimática em progênes para estimar o sistema reprodutivo em pomares de sementes. Num jardim clonal onde uma planta matriz é repetida várias vezes, a disposição das plantas pode levar a cruzamentos endogâmicos, proporcionando falso efeito de autofertilização (Shaw & Allard, 1982).

Sun & Ritland (1998) determinaram os parâmetros do sistema reprodutivo de *Centaurea solstitialis* L., por meio de nove sistemas enzimáticos, constatando taxa de cruzamento multilocos (t_m) variando de 94,8% a 99,0% nas oito populações avaliadas.

A análise do padrão eletroforético de progênes tem demonstrado que o sistema de cruzamento das espécies que compõem a floresta tropical varia de fertilização cruzada à autofertilização, porém em geral, as espécies são predominantemente ou completamente de fertilização cruzada (Murawski & Hamrick, 1991; 1992 e O'Malley et al., 1988).

Murawski et al. (1994), avaliando o sistema reprodutivo de *Shorea congestiflora* e *S. trapezifolia*, por meio dos padrões isoenzimáticos, constataram que 87% das sementes de *S. congestiflora* resultaram de fertilização cruzada, enquanto em *S. trapezifolia* havia mistura do sistema de cruzamento, com 56% e 62% nos dois anos consecutivos de realização do trabalho. Bawa & O'Malley (1987), utilizando-se de marcadores isoenzimáticos detectaram que *Pithecellobium pedicellare* apresenta 96,4% de fertilização cruzada.

Loveless & Hamrick (1987) analisando o sistema reprodutivo de 124 espécies, detectaram correlação altamente significativa entre o sistema reprodutivo e o coeficiente de diferenciação genética (CDG), sendo que espécies exogâmicas apresentaram valores mais baixos que as espécies de sistema reprodutivo misto ou endogâmicas.

Loveless et al. (1998), avaliaram o sistema reprodutivo de *Tachigali versicolor*, concluindo que a espécie apresenta cerca de 99,8% de cruzamento.

Young & Brown (1998) utilizaram oito locos isoenzimáticos para determinarem o sistema reprodutivo de *Daviesia suaveolens* Crisp. e *D. mimosoides* R. Br., constatando taxa de cruzamento multilocos de 78,0% a 100% para *D. suaveolens* e 71,0% a 96% para *D. mimosoides*.

2.12 Determinação do fluxo gênico dentro da população

Em populações naturais, a estrutura genética é determinada em grande parte pelo movimento dos genes via grão de pólen e dispersão das sementes. Nas espécies propagadas vegetativamente como a mandioca, a dispersão dos grãos de pólen tem importância na organização das variedades que serão levadas aos campos de cruzamentos com a finalidade de desenvolvimento de novas cultivares.

A dispersão dos grãos de pólen pode ser estudada avaliando-se o movimento físico, por: coleta dos grãos de pólen em pontos pré-determinados (Greenwood, 1986), marcação dos grãos de pólen com tinta fluorescente imperceptível pelos animais (Linhart et al., 1987), ou movimento dos polinizadores (Levin & Kerster, 1969; Mosquin, 1971). Os modelos de movimento do grão de pólen predizem que a densidade de pólen declina rapidamente a partir da fonte e a maior parte das fertilizações ocorrem nas plantas mais próximas da fonte de pólen (Faegri & Pijl, 1980). Os estudos de

movimento do pólen pode não refletir a fertilização real e o fluxo gênico dentro e entre populações locais.

Outra forma de determinar a migração dos grãos de pólen é avaliando a progênie de plantas com marcadores genéticos. Datta et al. (1982) determinaram a distância de migração dos grãos de pólen em juta (*Corchorus olitorius* L.) utilizando-se do caráter pigmentação do caule como marcador genético e constatou que a principal fonte de pólen estava localizada a 0,5 m de distância da planta avaliada e a distância máxima de migração foi de 9 m.

Maiti et al. (1981), utilizando-se do caráter formato da folha, constataram que as plantas de *Hibiscus cannabinus* L. recebem grãos de pólen de 0,5 m, sendo a distância máxima de 10 m.

Moresco (1999), utilizou-se do caráter que determina a presença de glândulas no caule do algodoeiro (*Gossypium spp.*), para determinar a distância de migração dos grãos de pólen e constatou a maior polinização (15,75%) entre as plantas mais próximas (cerca de 3 m), sendo que aos 10 m de distância a porcentagem de polinização foi reduzida para 1,04%.

Os estudos realizados por meio de isoenzimas em plantas polinizadas por insetos têm demonstrado que o fluxo gênico é, usualmente, maior que o observado pelo movimento físico dos grãos de pólen (Campbell, 1991).

Em plantas arbóreas as taxas de fluxo gênico medido por meio indireto entre indivíduos e entre populações tem sido relatada para várias espécies tropicais. Webb & Bawa (1983) demonstraram que os grãos de pólen podem mover-se a 225 m entre populações de *Malvaviscus arboreus*, espécie

polinizada por beija-flor. Por meio da análise de paternidade, Hamrick & Murawski (1990) demonstraram que 25% das polinizações em árvores polinizadas por abelhas *Platypodium elegans* estavam localizadas a mais de 750 m.

Loveless et al. (1998), utilizando marcadores isoenzimáticos, constataram que 21% dos grãos de pólen recebido pelas plantas de *Tachigali versicolor*, são originados de plantas que estavam distanciadas em 500 m.

Atualmente, análises para determinação de fluxo gênico via grãos de pólen e paternidade estão sendo realizadas por meio da técnica de microsatélite. Os microsatélites são pequenas sequências de DNA repetidas em tandem de 1 a 6 pb (pares de base), as quais são altamente polimórficas para o número de repetições (Ashley & Dow, 1994). A amplificação da região do microsatélite por reação de polimerase em cadeia (PCR), resulta em marcadores codominantes que ao contrário dos locos isoenzimáticos, apresentam variabilidade para determinar exclusão de parentesco (Chakraborty et al., 1988). Cada loco microsatélite tem muitos alelos raros (alelo com baixa frequência na população), e na maior parte dos casos todos os adultos no local podem ser excluídos da paternidade usando apenas alguns locos.

Dow & Ashley (1998) utilizaram quatro marcadores de DNA do tipo microsatélites para realizar a exclusão de paternidade numa população de 62 plantas adultas de carvalho (*Quercus macrocarpa*), constatando que as plantas produtoras de pólen de 57% dos descendentes analisados estavam localizados a mais de 75 m de distância da planta matriz.

Chase et al. (1996), utilizando-se de marcadores do tipo microsatélite, constataram movimento de grãos de pólen superior a 350 m em *Pithecellobium elegans*.

2.13 Paternidade em frutos

O modelo de cruzamento misto assume que sucessivos cruzamentos numa planta aparecem de amostras independentes de grãos de pólen originados da população total de parentais possíveis. Essa pressuposição pode ser mais apropriada para plantas polinizadas pelo vento, cujo fruto apresenta apenas uma semente, do que para as plantas polinizadas por animais, onde desvios de cruzamento ao acaso resultam do comportamento do polinizador (Morgan & Barrett, 1990 e Schoen & Clegg, 1984).

As progênies de polinização cruzada originadas a partir de frutos com muitas sementes podem ter o mesmo parental masculino se o pólen que lhe deu origem for derivado de uma fonte de polinização (Brown et al., 1985) ou se existe limitado fluxo de pólen (Ritland, 1989). Assim como, quando o número de parentais masculinos é baixo ou o cruzamento é principalmente entre os vizinhos mais próximos (Surles et al., 1990), ou se o pólen é depositado como múltiplos grãos, como em polínias (Muoma, 1991).

A multiplicidade de paternidade num fruto pode ocorrer pela deposição de uma ou mais cargas de pólen de diferentes parentais masculinos por somente um polinizador, conforme constatado por Epperson & Clegg (1987) em

Ipomoea purpurea e Marshall & Ellstrand (1985) em *Raphanus sativus*, ou por visita sequencial de diversos polinizadores carregando grãos de pólen de diferentes fontes ou carregando mistura de pólen em *Mimulus guttatus* (Dudash & Ritland, 1991).

A multiplicidade de paternidade tem sido detectada em alta frequência em espécies polinizadas por insetos, conforme constatado por Brown et al. (1986) em *Glycine argyrea*, Morgan & Barrett (1990) em *Eichhornia paniculata*, Muoma et al. (1991) em *Acácia melanoxylon* e Schoen & Clegg (1984). Segundo Brown & Allard (1970), Clegg et al. (1978) e Ritland (1986) a maioria dos modelos de reprodução mista apresentam progênie resultante da mistura de plantas meios-irmãos e autofertilizações; entretanto, Ritland (1988, 1989) descreve eventos de cruzamentos de autofertilização correlacionada e modelo de paternidade usando “pares de irmãos”. De acordo com esse modelo, duas plantas de mesmo parental feminino podem ser de autofertilização, uma autofertilizada e a outra de cruzamento ou ambas de cruzamento. Se o cruzamento não é aleatório, então as duas plantas irmãs de polinização cruzada podem ter o mesmo ou diferentes pais. A proporção de irmãos-completos entre plantas resultantes de polinização cruzada é designada por r_p , que é a correlação de paternidade cruzada.

Sampson (1998) estimou o nível de múltipla paternidade e cruzamento correlacionado nos frutos de *Eucalyptus rameliana*, por meio de seis locos isoenzimáticos. A correlação de paternidade cruzada (r_p) foi positiva e

significativa dentro de frutos (26%) e o número de parental paternal efetivo por fruto foi de 3,85.

Yates et al. (1997), utilizaram cinco locos isoenzimáticos para avaliar o desempenho das abelhas do gênero *Apis* como vetores de pólen em trevo branco (*Trifolium repens*), constando que 50% dos frutos analisados continham sementes obtidas a partir de óvulos fertilizados por pólen de duas fontes, 25% com três ou quatro fontes e nenhuma com apenas uma fonte. Dentro de inflorescência, 70% das sementes possuíam a mesma paternidade. Dentro de frutos individuais, uma seleção paternal dominou; em frutos contendo duas, três ou quatro paternidades a seleção paternal dominante aconteceu para 75%, 60% e 60%, respectivamente.

Campbell (1998) analisou múltipla paternidade nos frutos de *Ipomopsis aggregata*, planta cujo fruto apresenta 2 a 14 sementes, por meio de dez locos isoenzimáticos através de análise de exclusão, constatando múltipla paternidade em 68% dos frutos analisados. A autora também observou que o número de pais por fruto aumenta com o número de sementes por fruto. A grande quantidade de pólen carregada pelo polinizador e, conseqüentemente, mistura da carga de pólen foi a explicação para o nível de múltipla paternidade nas populações naturais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os dados sobre o sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade de mandioca foram coletados num experimento, denominado de roça experimental, instalado na Área Experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP, localizada no município de Piracicaba, Estado de São Paulo, no período de 1996 a 1999. O Experimento foi implantado dia 30 de novembro de 1996.

3.1.1 Descrição das etnovariedades de mandioca analisadas

A roça experimental de mandioca foi formada por 55 etnovariedades originadas da Amazônia brasileira e do Estado de São Paulo (coletadas no ano de 1992) e a cultivar Mantiqueira lançada pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC. As etnovariedades foram identificadas pela denominação DG (Departamento de Genética) e o número de entrada na referida coleção (Tabela 1).

Tabela 1. Relação das etnovariedades de *M. esculenta* analisadas, listadas segundo o número de identificação da coleção ESALQ/USP, local de coleta (comunidade/roça), nome local, uso e origem do material. Piracicaba, ESALQ/USP, 1996.

DG	Roça/ Local de coleta	Nome Local	Uso	Distribuição Geográfica
38	Comunidade Piloto/Barcelos	Maniva Inajá	Farinha	RIO NEGRO AM
39	"	Macaxeira Branca	Mesa	"
41	"	Sem Nome	Farinha	"
42	"	Mandioca S. João	Farinha	"
43	"	Pretinha	Farinha	"
44	Comunidade D. Pedro II /Barcelos/Anati	Mandioca do Antônio	Farinha	"
45	"	Macaxeira	Mesa	"
46	"	Orelha de Burro	Farinha	"
47	Roça-1/ Carvoeiro	Mamaroca	Farinha	"
48	"	Tartaruga	Farinha	"
49	"	Amarela II	Farinha	"
50	"	Olho Roxo	Farinha	"
51	"	Pretinha	Farinha	"
52	"	Seis Meses	Farinha	"
54	"	Antinha	Farinha	"
55	"	Anará	Farinha	"
56	Roça-1/ Carvoeiro	Araoari	Farinha	"
58	"	Amarela I	Farinha	"
59	"	Samuauma	Farinha	"
60	"	Sem Identificação	Farinha	"
61	"	Macaxeira	Farinha	"
62	"	Sem Identificação-2	Farinha	"
65	Roça-1/Marará	Anará	Farinha	RIO BRANCO RR
67	"	Roxinha	Farinha	"
68	Roça-1/ Castanho	Macaxeira Pão	Farinha	"
69	"	Camarão	Farinha	"
70	Roça-1/ Panacarica	Tala Encarnada	Farinha	"
73	"	Socó	Farinha	"
111	Roça-1/ Comunidade São Sebastião/Varini	Geoató	Farinha	RIO SOLIMÕES AM
112	"	Pretinha	Farinha	"
113	"	Antinha	Farinha	"

DG	Roça/ Local de coleta		Nome Local	Uso	Distribuição Geográfica
115	Roça-1/ São João/Guarabira	Comunidade	Maguari	Farinha	RIO SOLIMÕES AM
116		"	Ourinho	Farinha	"
117		"	Caneorá	Farinha	"
118		"	Macaxeira	Farinha	"
119		"	Macaxeira	Farinha	"
120		"	Antinha	Farinha	"
121		"	Turuna	Farinha	"
123		"	AntinhaXMarreca (híbrido)	Farinha	"
124		"	Macaxeira	Farinha	"
125	Roça-1/Lago Ananã		Sem identificação	Farinha	"
138	Lago Maniã		Antinha	Farinha	"
126	Cananéia		Aipim Roxo	Farinha	VALE DO RIBEIRA SP
127		"	Aipim Roxo – Semente	Farinha	"
128		"	Manteiga	Mesa	"
129		"	Aipim Mata Fome	Mesa	"
130		"	Vassourinha	Mesa	"
131		"	Manteiguinha	Mesa	"
132		"	Aipim Roxo	Mesa	"
133	Ilha Comprida		Manteiga	Mesa	"
134		"	Aipim Roxo	Mesa	"
137	Campinas		Mantiqueira	Mesa	"
17	Icapara/Iguape		Jurema	Farinha	"
23	Comunidade São Pedro/Eldorado		Pão do céu	F/Mesa	"
139	Quintal/Monte Alegre		Macaxeira Sebo	Mesa	RIO AMAZONAS PA
197	Belém		Mandiocaba	Maniçoba/ Comida	"

As etnovariedades foram agrupadas na roça experimental conforme as roças em que foram coletadas, numa disposição parapátrica, ou seja, uma roça colocada ao lado da outra; dessa forma, uma etnovarietade encontrava-se rodeada por outras etnovariedades de mesma roça, conforme se encontrava no local de origem (Figura 2).

A roça experimental de mandioca foi implantada em local isolado da Área Experimental da ESALQ/USP, onde não existiam outras plantas de mandioca, em espaçamento de 2x2m, sendo cada etnovarietade representada por apenas uma planta. Foram sorteadas 7 etnovariedades (DG – 55, DG – 61, DG – 62, DG – 118, DG – 125, DG – 128 e DG - 139) e escolhida a variedade comercial Mantiqueira para a determinação do sistema reprodutivo.

3.1.2 Obtenção das progênies de polinização livre

Nas oito plantas utilizadas na avaliação genética (matrizes), os frutos próximos a maturação, resultantes de polinização aberta, foram protegidos individualmente com saquinhos confeccionados com o tecido “tule” para a coleta das sementes.

As sementes coletadas foram levadas ao laboratório para verificação do desenvolvimento dos cotilédones e endosperma, por meio da análise física (rompimento da casca). Após essa operação foram colocadas para germinar em vasos contendo vermiculita como substrato (Figura 3a) e após a obtenção das plântulas foram transplantadas para vasos maiores contendo terra (Figura

Legenda: Estado do Amazonas - rio Negro

Estado do Amazonas - rio Solimões

Estado de Roraima - rio Branco

Estado do Pará – rio Amazonas

Estado de São Paulo – vale do Ribeira

Figura 2: Disposição das etnovariiedades de mandioca na roça experimental.

Piracicaba, ESALQ/USP, 1996.

Figura 3. Obtenção das progênes de mandioca de polinização livre. a: fase de germinação das sementes e b: plantas jovens originadas a partir das sementes de um fruto com três sementes. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

3b). As plantas foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Genética da ESALQ/USP até completar número mínimo de 12 indivíduos por progênie, para a realização da análise genética.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise isoenzimática

Numa etapa preliminar, foi adaptado o protocolo de eletroforese de isoenzimas (migração das formas alternativas de uma mesma enzima) em gel de poliacrilamida em gradiente para *M. esculenta*, pois não existe referência bibliográfica relacionada a utilização dessa técnica em plantas do gênero *Manihot*. Após a etapa de definição da metodologia de laboratório, procedeu-se a avaliação genética com base nos padrões isoenzimáticos.

3.2.1.1 Extração das enzimas

A extração das enzimas foi realizada em folhas recém-expandidas de plantas adultas (um a três anos de idade) e das progênies (dois meses a dois anos). Foi utilizado amostra de tecido foliar de cada material a ser analisado (200 mg) macerada em nitrogênio líquido (-196°C) em *eppendorff* de 1,5 ml, procedimento semelhante ao usado no CENARGEN para extração de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Foi usado 800 μl da solução extratora número

1, recomendada por Alfenas et al. (1991), exceto a utilização de dieca (dicarbamato de sódio) e mercaptoetanol (Apêndice 1). O macerado foi centrifugado a 15 000 rpm (23 000 g) por 30 minutos numa centrífuga refrigerada. O extrato bruto resultante (sobrenadante) foi utilizado nas corridas eletroforéticas.

3.2.1.2 Preparação dos Géis

A técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida descontínuo em gradiente é constituída pela migração das enzimas sob influência de um campo elétrico através de dois géis: o gel concentrador e o separador construído em gradiente. Os géis são confeccionados em diferentes pH e concentração de acrilamida (Hames, 1996). Para a produção dos géis foram preparadas as soluções estoque (Apêndice 2).

Foram utilizadas dois tipos de cubas para a realização das corridas eletroforéticas: uma cuba grande Protean XX da Biorad, cujo gel separador apresentou 0,75 mm de espessura, 16 cm de altura e 16 cm de largura; e uma cuba pequena, confeccionada artesanalmente, cujo gel apresentou 1,5 mm de espessura, 10 cm de altura e 22 cm de comprimento.

O gel em gradiente linear é formado a partir da mistura de duas soluções de mesmo volume e concentrações diferentes de acrilamida. A solução menos concentrada dilui a solução mais concentrada até a obtenção do gradiente decrescente em relação ao tamanho dos poros do gel, ou seja, analisando um

gel separador no qual será realizada a eletroforese vertical, observa-se que no topo apresenta menor concentração de acrilamida, e portanto, poros maiores, e na parte basal apresenta maior concentração de acrilamida, conseqüentemente, poros menores (Whestermeier, 1993).

A preparação de um gel em gradiente de 5% a 6% de 30 ml é realizada por 15 ml de solução de gel a 5% e 15 ml de solução de gel a 6%. Os testes preliminares demonstraram que os melhores resultados foram obtidos em gel com essa constituição.

Preparação da solução de gel a 5%.

Solução A: 1,8 ml

Solução C: 2,5 ml

Solução D: 0,2 ml

H₂O: 10,5 ml

Total 15,0 ml

Procedimento: as soluções são misturadas, exceto a solução D, a qual será adicionada no momento em que for confeccionado o gel em gradiente.

Preparação da solução de gel a 6%.

Solução A: 1,80 ml

Solução C: 3,00 ml

Sacarose: 1,25 ml (2,25 g)

Solução D: 0,20 ml

H ₂ O:	8,75	ml
Total	15,00	ml

Procedimento: as soluções são misturadas, exceto a solução D, a qual será adicionada no momento em que for confeccionado o gel em gradiente.

A sacarose tem a função de manter o gradiente. A ausência de sacarose causaria a mistura dos poros maiores e menores no gel, e dessa forma não produziria um gel em gradiente linear de 5% na parte superior e 6% na parte inferior.

A mistura das duas soluções foi realizada pelo marcador de gradiente produzido pela Pharmacia. O marcador de gradiente é formado por dois cones (reservatórios) de mesma altura e diâmetro interligados (Figura 4). Antes de iniciar a confecção do gel é fechada a comunicação entre os dois reservatórios (A e B) e da válvula que permite o fluxo do gel para o cassete (união das placas de vidro separadas por espaçadores, que serve como molde para a formação do gel). O marcador de gradiente fica sobre um agitador magnético a 5 cm de altura da parte superior do cassete. No reservatório A é colocado 15 ml da solução menos concentrada (5%) e no B, 15 ml da solução mais concentrada (6%). Em seguida é colocado 200 µl da solução D em cada reservatório. No reservatório B é colocado uma barra magnética, a qual, sob ação do agitador magnético, tem a função de misturar as duas soluções de gel; em seguida é introduzido a varinha de compensação no reservatório A, a qual apresenta a

Figura 4. Marcador de gradiente e construção de um gel em gradiente linear de concentração de acrilamida.

função de compensar o peso exercido pela barra magnética no reservatório B. A ausência da varinha de compensação causaria fluxo da solução mais concentrada em direção à menos concentrada quando o canal de comunicação entre os dois reservatórios é aberto. Então, é ligado o agitador magnético e ao mesmo tempo é liberado o canal de interligação entre os dois reservatórios e o dispositivo que permite a passagem do gel até o cassete.

Após ao término do fluxo de gel, via gravidade, até as placas de vidro é formado um gel de forma que a parte basal apresentará concentração de 6% e a parte superior, a qual ficará em contato com o gel concentrador, 5%. É adicionado 1,5 ml de álcool isopropílico, cujo objetivo é evitar contato entre o ar atmosférico e o gel separador, e permitir que ocorra a polimerização (passagem da solução do estado líquido para o estado gelatinoso) e formação de linha uniforme ao longo do gel separador. A polimerização ocorreu em 20 minutos.

O gel concentrador (3,75%) tem a função de organizar as proteínas conforme o tamanho e carga, pois apresenta os poros maiores que o gel separador e a eletroforese é realizada em menor voltagem ou amperagem.

Preparação de 20 ml de gel a 3,75%:

Solução B:	5,0	ml
Solução C:	2,5	ml
Solução E:	2,5	ml
H ₂ O:	10,0	ml
Total	20,0	ml

Após a polimerização do gel separador, descarta-se o álcool isopropílico e verte-se a solução do gel concentrador. Em seguida, é colocado o “pente”, peça de plástico ou *teflon* que serve como molde para a formação das canaletas. Após a polimerização do gel, no local em que seriam os “dentes” do pente, ficam entradas denominadas de canaletas, local em que é colocada a amostra contendo as enzimas do indivíduo a ser analisado. Foram utilizados “pentes” que formam 15 canaletas, portanto sendo analisados 15 indivíduos diferentes por gel. A polimerização ocorreu em 45min, sob a ação de luz fluorescente, pois a riboflavina utilizada como catalizador precisa da luz com esse comprimento de onda. Após a polimerização do gel concentrador, o cassete foi colocado na cuba para a realização da eletroforese.

3.2.1.3 Preparação das amostras, “carregamento” do gel e eletroforese

A partir do extrato bruto (líquido sobrenadante resultante da centrifugação) foram retiradas três alíquotas de 120 μ l. A alíquota foi diluída em 300 μ l da solução formada pelo tampão Tris-HCl pH 6,8 e o corante *Coomassie blue* (0,002%). O corante é utilizado para formar o “fronte”, linha formada por pequenas moléculas que migram mais rápido que as enzimas menores, indicando que as enzimas estudadas estão do “fronte” para atrás. As demais alíquotas foram congeladas para serem utilizadas em corridas posteriores.

O termo “carregamento” do gel é denominação atribuída a ação de colocar as amostras nas canaletas formadas no gel concentrador. Foi colocado 70 μ l de amostras em cada canaleta.

A eletroforese foi realizada em cuba vertical, sendo utilizado 1,2 l e 1,5 l de tampão de corrida na cuba pequena e grande, respectivamente. As corridas foram desenvolvidas no período da noite (*overnight*). Foi utilizado 60 e 80 volts por cinco horas (eletroforese em gel concentrador) e 90 e 120 volts por 11 horas (eletroforese em gel separador) nas cubas pequena e grande, respectivamente.

3.2.1.4 Revelação histoquímica das enzimas

Após o desenvolvimento das corridas eletroforéticas (migração das enzimas através dos géis sobre ação do campo elétrico) foi realizada a revelação histoquímica das enzimas. Na amostra colocada na canaleta, as enzimas estão misturadas; após a eletroforese, todas as enzimas existentes na amostra inicial ficam distribuídas ao longo do percurso de migração, organizadas de forma decrescente de peso molecular em direção ao polo positivo. As enzimas com mesmo peso e carga elétrica migram juntas e a reunião dessas enzimas formam as “bandas”. A detecção de determinada enzima (banda) é realizada pelo reconhecimento dessa proteína pelo substrato específico colocado na solução de revelação. Em geral, a solução de revelação

é composta pelo substrato específico; solução tampão, a qual mantém o pH necessário para a expressão da enzima; e um corante, o qual permite a visualização do produto da reação histoquímica.

Foram avaliados oito sistemas enzimáticos, empregando-se os protocolos descritos por Alfenas *et al.* (1991) e aperfeiçoados no Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada - LEEGA, os quais são listados e descritos no Apêndice 3.

3.2.1.5. Documentação e interpretação genética dos géis

Após a revelação das isoenzimas, os géis foram lavados em água destilada, fotografados e fixados em solução de glicerina a 10%, por 15 minutos. Após esse procedimento foram elaborados os zimogramas, representação esquemática das bandas visualizadas, em papel milimetrado. Os zimogramas foram construídos respeitando-se as distâncias entre as bandas e a linha de migração formada pelo *fronte*, visualizados no gel.

Foram obtidos os valores de referência (Rf), conforme Alfenas *et al.* (1991), onde:

$$Rf = di/db$$

sendo:

Rf = valor de referência;

di = distância de migração da banda em questão;

db = distância de migração do *fronte*.

Os valores de referência foram importantes na determinação dos locos e alelos entre géis diferentes. Foram avaliados oito sistemas enzimáticos, nos quais foram identificados 10 locos polimórficos. Os demais locos polimórficos detectados não foram avaliados em decorrência da falta de clareza no padrão eletroforético. Os sistemas enzimáticos e a designação dos locos são os seguintes: citosol aminopeptidase (*Cap1*, *Cap2*), glucose 6-fosfato isomerase (*Gpi1*), xiquimato desidrogenase (*Skdh*), glucose 6-fosfato desidrogenase (*G6pdh*), aspartato aminotransferase (*Aat1*, *Aat2*), glutamato desidrogenase (*Gtdh*), fosfatase ácida (*Acp1*) e Catalase (*Cat1*). Na determinação do sistema reprodutivo foram utilizados todos os locos, exceto os locos *Cap2* e *Aat1* e na determinação do fluxo gênico e paternidade somente não foram utilizados os locos *Cap2* e *Cat1*.

A análise genética foi realizada da seguinte forma: considera-se que um loco de uma enzima monomérica tem dois alelos **A** e **a**, com herança codominante como é observado na maior parte dos locos isoenzimáticos. O genótipo homozigoto para o alelo **A** é **AA**, enquanto o genótipo homozigoto para o alelo alternativo é **aa**. O heterozigoto apresenta uma cópia de cada alelo (**A** e **a**). Considerando que o alelo **A** codifica uma enzima com maior peso molecular, do que o alelo **a**, no gel serão observadas duas bandas em posições diferentes, sendo que a enzima de maior peso molecular migrará menor distância do que a enzima de menor peso molecular. Portanto, o indivíduo homozigoto portador do genótipo **AA**, o qual apresenta o alelo que codifica a enzima de maior cadeia apresentará uma banda, sendo o mesmo observado

para o indivíduo homozigoto alternativo **aa**; entretanto o indivíduo heterozigoto (**Aa**) apresentará as duas bandas de diferentes tamanhos, resultantes dos dois tipos de alelos, ou seja, com uma banda como a mesma distância de migração que a banda do indivíduo com o genótipo homozigoto **AA**, apresentando a metade da intensidade e a outra banda, na mesma distância de migração que a do indivíduo com o genótipo alternativo homozigoto **aa**, também apresentando a metade da intensidade.

Em linguagem matemática o alelo **A** é representado pelo número 1 e o alelo **a** é representado pelo 2. Então, o indivíduo homozigoto (**AA**) é designado como 11 e o homozigoto alternativo **aa** como 22; por sua vez o heterozigoto **Aa** é denominado 12. Dessa forma, os dados genéticos foram introduzidos nos programas de computador para a realização das análises.

3.2.2 Determinação do Sistema Reprodutivo

A determinação do sistema reprodutivo foi realizada por meio da estimativa da taxa de cruzamento multilocos (t_m), com base nas frequências alélicas obtidas pelo método de máxima verossimilhança. Ritland & Jain (1981) desenvolveram um modelo para estimação da taxa de cruzamento e frequência gênica usando locos independentes que estimam a relação entre cruzamentos endogâmicos e autofertilização.

A t_m , t_s (taxa de cruzamento uniloco: média dos locos individualmente), a diferença entre t_m e t_s (que indica o cruzamento entre indivíduos aparentados) e

as frequências alélicas de pólen e óvulo na população, foram estimadas utilizando-se do programa *Multilocus Mating System* (MLTR), versão 1.1, proposto por Ritland (1996). Em todas as análises o erro padrão foi obtido empregando-se 500 *bootstraps*.

O modelo matemático utilizado pelo programa exige que os locos sejam independentes e que não existam cruzamentos dirigidos. A heterogeneidade das frequências de pólen e óvulo foram avaliadas por meio do teste χ^2 , conforme propõem Workman & Niswander (1970):

$$\chi^2 = N F_{ST} (a-1)$$

onde:

N = número total de gametas

F_{ST} = divergência genética entre gameta masculino e gameta feminino, calculada com base em:

$$F_{ST} = \sigma_p^2 / [p (1-p)]$$

sendo:

p = frequência de um determinado alelo

a = número de alelos por loco

3.2.3 Quantificação da movimentação do pólen

O experimento foi implantado em campo isolado, ou seja, onde não haviam outras plantas de mandioca que realizassem cruzamentos, portanto toda a descendência resultante na roça experimental era oriunda de cruzamentos ou autofertilização dos genótipos que formam a população. Foi determinado o padrão eletroforético dos 56 genótipos possíveis de serem o parental masculino, dos oito genótipos escolhidos ao acaso (matrizes) e das progênes. A distância entre os genótipos foi estabelecida (2x2 m), e então foi possível identificar a distância que as matrizes recebem os genes via grão de pólen.

O padrão isoenzimático (bandas) dos indivíduos que compõem a roça experimental foi convertido em dado binário (presença = 1 e ausência = 0) (Apêndice 4), então procedeu-se a análise estatística multivariada de agrupamento hierárquico aglomerativo fundamentada na matriz de distância Euclidiana simples, coeficiente de similaridade proposto por *Jaccard* e algoritmo de ligação média não ponderada (UPGMA) realizada através do programa FITOPAC, versão 1.0, para avaliar a divergência genética entre os genótipos que formam a roça experimental.

A análise de agrupamento foi utilizada para avaliar a variabilidade genética quantificada pelos sete sistemas enzimáticos. Se não houvesse grande distinção entre os parentais, seria necessário aumentar o número de marcadores estudados.

O fluxo gênico foi determinado por meio da distância em que se encontrava o parental masculino. Para a determinação da paternidade, foi desenvolvido o programa de computador denominado de PATER (**p**aternidade), *software* que determina a paternidade de um indivíduo num universo conhecido de possíveis parentais. O protótipo funcional do programa está sendo distribuído gratuitamente em fase experimental no endereço da *Home page*: <http://www.ciagri.usp.br/paterprog/>

O programa foi desenvolvido em ambiente Delphi (linguagem Pascal), para Windows 95/98/NT. A partir do genótipo do parental feminino e prole, é calculado, segundo a herança monogênica, quais os genótipos possíveis para o parental masculino num determinado número de alelos existente na população que forma a roça experimental. Os genótipos possíveis para cada loco foram comparados com os genótipos dos possíveis parentais (candidatos). À coincidência positiva foi atribuída a nota 1 e à não coincidência a nota 0. Após a comparação com todos os locos obtém-se uma média final. O parental masculino com maior valor para média final, apresenta a maior probabilidade de ser o parental masculino do indivíduo investigado.

Como exemplo, será avaliada a paternidade de um indivíduo entre quinze possíveis parentais (candidatos). A análise foi realizada utilizando-se de seis locos codominantes com os locos variando de 2 a 5 alelos. No arquivo de dados serão encontrados dados de locos dominantes. O programa analisa dados de locos com tipo de herança dominante, codominante e a combinação dos dois tipos de herança.

Estrutura do Arquivo de entrada de dados.

03 06 } número de locos (dominantes e codominantes).

0 1} genótipo dominante (coluna 1 – genótipo do parental feminino / coluna 2-

1 0 genótipo da prole).

0 1

12 11 5 } genótipos codominantes (coluna 1- genótipo do parental feminino /

13 33 5 coluna 2 – genótipo da prole / coluna 3 – número máximo de alelos do
23 33 3 loco).

24 25 5

33 35 5

12 22 2

15 03 15 06 } Coluna 1- número parentais avaliados / coluna 2 – número de
 locos dominantes a serem analisados / coluna 3 – número de
 parentais avaliados / coluna 4 – número de locos codominantes
 a serem analisados.

0 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0 1 1 0 } genótipos dominantes dos parentais investigados.

0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0

0 1 0 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0 1 0

22 13 33 11 22 22 11 22 11 12 12 23 14 23 25 } genótipos codominantes

13 33 23 23 33 22 23 13 22 12 14 23 35 13 12 dos parentais investigados.

13 22 23 22 33 22 13 13 11 12 23 33 22 12 13

23 24 35 15 25 35 25 15 25 35 45 35 15 23 15

11 12 22 45 12 12 25 22 12 11 11 35 22 12 11

11 22 12 12 11 22 12 11 12 22 22 11 12 12 11

No arquivo de saída dos resultados é encontrado: o tipo de herança dos locos analisados, no caso do exemplo citado, locos com tipo de herança codominante, o padrão genotípico do parental feminino, da prole e os genótipos que formam as combinações possíveis do padrão genotípico do parental

verdadeiro e o número de combinações realizadas com os genótipos possíveis para o parental verdadeiro. Observa-se, também, no arquivo de entrada: a lista com os parentais possíveis; número de combinações em que pelo menos um genótipo do parental coincidiu com alguma combinação possível para o parental verdadeiro (N); número de vezes que o parental apresentou similaridade maior que 80% com alguma combinação do parental verdadeiro; média entre os valores acima de 80% entre o parental investigado e uma das possíveis combinações do parental verdadeiro; o máximo de coincidência entre o parental investigado e alguma das combinações possíveis para o parental verdadeiro; data e tempo de processamento da análise.

O parental que apresenta a maior coincidência com uma das combinações possíveis é considerado o parental verdadeiro do indivíduo investigado. No presente exemplo, o parental masculino do indivíduo investigado é o de número 7. A análise foi realizada num tempo de 26 segundos e 600 milésimos.

Calculate codominant

12 x 11 -> 11 12 13 14 15

13 x 33 -> 13 23 33 34 35

23 x 33 -> 13 23 33

24 x 25 -> 15 25 35 45 55

33 x 35 -> 15 25 35 45 55

12 x 22 -> 12 22

Combinations: 3750

Parent	N	>0.8	Mean	Máx.
1	1750			
2	2550			
3	2950			
4	2982	3	0,83	0,83
5	2150			
6	2250			
7	3238	20	1,00	1,00
8	2150			
9	2550			
10	2550			
11	2950			
12	2726	2	0,83	0,83
13	2790			
14	2250			
15	1750			

Início: 12/4/2000 - 16:52:11:830

Fim : 12/4/2000 - 16:52:26:600

Após a determinação da paternidade das progênies os parentais foram distribuídos em classes de dois metros, distância mínima entre duas plantas na roça experimental.

3.2.4 Determinação da paternidade das sementes de um fruto

Após a determinação da paternidade das plantas originadas a partir de sementes do mesmo fruto colocadas para germinar no mesmo vaso, foi possível analisar a grau de parentesco entre as plantas resultantes do fruto com duas e três sementes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das progênies

As primeiras sementes foram colhidas nove meses após a instalação da roça experimental. A germinação das sementes ocorreu em média de dez dias no verão e 20 dias no inverno após a semeadura. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e 12 indivíduos de 8 progênies foram utilizados para a realização da análise genética.

Dos 204 frutos analisados, 45 (22,06%), 70 (34,31%) e 89 (43,63%) apresentavam 1, 2 e 3 sementes, respectivamente (Tabela 2). O resultado do teste de germinação revelou que sementes obtidas de frutos com apenas uma semente, apresentam 55,56% de germinação, enquanto sementes oriundas de frutos com duas ou três sementes apresentam 29,29% e 28,09% de germinação, respectivamente. Portanto, quando um fruto de mandioca é formado, apresenta maior probabilidade de conter duas ou três sementes; entretanto, sementes originadas de fruto com apenas uma semente, apresenta maior probabilidade de germinar. Os genótipos com alta proporção de frutos com uma semente, a exemplo da variedade Mantiqueira (DG – 137), apresentam maior probabilidade de deixar descendentes.

Tabela 2: Número de frutos (NF), número de sementes (NS), número de sementes germinadas (SG) de oito etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.

DG	Fruto com uma			Fruto com			Fruto com três			Total		
	semente			duas sementes			sementes					
	NF	NS	SG	NF	NS	SG	NF	NS	SG	NF	NS	SG
55	11	11	3	10	20	12	11	33	14	32	64	29
61	3	3	2	3	6	4	6	18	7	12	27	13
62	5	5	2	13	26	2	7	21	10	25	52	14
118	5	5	3	4	8	2	15	30	13	24	58	18
125	4	4	3	7	14	1	18	54	13	29	72	17
128	2	2	2	15	30	6	17	51	10	34	83	18
137	11	11	9	4	8	7	2	6	3	17	25	19
139	4	4	1	14	28	7	13	39	5	31	71	13
Total	45	45	25	70	140	41	89	267	75	204	452	141

A porcentagem média (37,65%) de germinação das sementes dos oito genótipos estudados e as características de pseudo-sementes (sementes com cotilédones e endosperma mal formados ou inexistentes), encontrados no presente trabalho estão de acordo ao encontrado por Ogburia & Adachi (1995).

Fukuda & Cerqueira (1986) e Valle (1990) constataram porcentagem de germinação de sementes verdadeiras em torno de 80%, portanto, bem superior ao encontrado neste trabalho. A maior porcentagem de germinação obtida pelos autores, possivelmente, deve-se ao diferente método de estimacão das sementes verdadeiras e aos genótipos analisados serem utilizados em programas de melhoramento. É importante quantificar a produção e germinação de sementes verdadeiras em etnovariedades, material melhorado pelo processo convencional e espécies afins da mandioca para que seja avaliado o efeito da domesticação na reprodução da espécie.

A influência do material genético deverá ser melhor estudada, pois plantas que produzem grande quantidade de frutos com uma semente, apresentam menor porcentagem de formação de pseudo-sementes, indicando seleção sexual entre as etnovariedades.

As 141 sementes que germinaram, originaram 113 plantas que foram utilizadas nas análises para a determinação do sistema reprodutivo, sendo que destas 104 foram utilizadas na determinação da distância do fluxo de pólen e paternidade.

4.2 Avaliação isoenzimática

A utilização do gel de poliacrilamida, como meio suporte, para a migração das isoenzimas nos estudos de genética de populações é citado como um método alternativo por May (1992) e Murphy et al. (1996), em decorrência de apresentar a produção de um gel de cada vez, baixo número de amostras, ser tóxico, etc. Atualmente, são produzidas cubas para eletroforese que permitem correr dois ou mais géis ao mesmo tempo. Um gel de amido permite revelar cinco sistemas enzimáticos diferentes (Murphy et al., 1996), contudo o gel de poliacrilamida apresenta melhor resolução, proporcionando análise mais exata dos padrões eletroforéticos.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente, modificação da técnica convencional, possibilita ao pesquisador ter um completo domínio sobre as condições de porosidade do gel, possibilitando fazer alterações para proporcionar o melhor padrão de separação das bandas e, conseqüentemente, obter melhor padrão eletroforético; constituindo-se numa técnica com grande poder de separação molecular, pois possibilita separar não somente com base na carga da enzima, mas também no seu tamanho. As isoenzimas são formas alternativas de uma mesma molécula, dessa forma apresentando pequenas mudanças na estrutura da enzima, as quais são mais detectadas por meio dessa técnica.

Os produtos utilizados na técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de amido, em geral, são tóxicos, e as precauções utilizadas servem também para o manuseio da acrilamida.

Outro ponto enfocado contra a utilização da acrilamida como meio suporte é o fato de apresentar custo mais alto que outros meios utilizados. A acrilamida em comparação com a penetrose (amido de milho), a qual pode ser obtida com praticamente custo zero, pode ser considerada mais onerosa; entretanto; o gel de poliacrilamida é, praticamente, transparente, dessa forma necessitando, em média, 25% a menos de solução de revelação das enzimas. A solução de revelação é a parte mais onerosa do processo de eletroforese de isoenzimas, variando de 1 a 5 dólares a cada sistema avaliado (Murphy et al., 1996), e a economia proporcionada pelo gel de poliacrilamida supera o custo da produção de um gel de 30 ml como utilizado neste trabalho.

A solução extratora número 1 proposta por Alfenas et al. (1991), sem a adição de DIECA e mercaptoetanol apresentou bom resultado na extração das enzimas (Apêndice 1). As extrações das enzimas a partir de folhas recém-expandidas resultaram em padrões de bandas nítidas na maior parte dos sistemas avaliados. A utilização desse tecido foliar não causou a destruição dos indivíduos analisados, permanecendo as plantas praticamente intactas para avaliações em campo.

O número de trabalhos publicados que apresentam padrões eletroforéticos de isoenzimas em espécies do gênero *Manihot* é pequeno, sendo algumas vezes contrastantes (Borsoi Filho, 1995; Faraldo, 1994; 1999;

Hussain et al., 1987; Lefèvre & Charrier, 1993; Peroni, 1998; Ramirez et al., 1987; e Sambatti, 1998).

Com base nos resultados obtidos para os sistemas enzimáticos testados, optou-se por utilizar oito sistemas (CAP, GPI, SKDH, G6PDH, AAT, GTDH, ACP e CAT), os quais apresentaram os melhores padrões eletroforéticos para o tecido estudado.

As Figuras 5 a 11 ilustram os padrões eletroforéticos observados nos géis que permitiram análise não duvidosa e cujos locos foram determinados a partir dos R_f (valores de referência), conforme recomendações de Alfenas *et al.* (1991). Os padrões fenotípicos observados nas fotografias e zimogramas (exceto para a enzima catalase) para os oito sistemas analisados sugerem a existência de 10 locos polimórficos. Pode ser constatado que somente foram analisados os locos que apresentam clareza no padrão de separação das bandas e interpretação genética.

Na avaliação da enzima Citosol aminopeptidase (CAP - E.C. 3.4.11.1), conhecida anteriormente como Leucil Aminopeptidase (LAP ou AMP), constatou-se a formação de dois locos isoenzimáticos bem definidos (*Cap-1* e *Cap-2*). O loco *Cap-1* apresentou indivíduos heterozigotos com duas bandas, caracterizando o loco como monomérico (1 subunidade polipeptídica). O loco *Cap-2* comportou-se com herança do tipo dominante, apresentando o alelo B em alguns indivíduos, nunca apresentando heterozigotos e quando a progênie da DG – 128 foi analisada, 55,56% dos indivíduos apresentaram o alelo B, constatando que trata-se de um gene nuclear, pois se estivesse localizado nas

organelas (cloroplasto ou mitocôndria) apresentaria a mesma herança da planta-mãe. A comprovação do tipo de herança desse loco deverá ser realizada por meio de cruzamentos controlados, pois não existe registro de marcador dominante para essa enzima no gênero *Manihot*. O terceiro loco, o qual seria denominado de *Cap-3* não foi analisado por não apresentar nitidez das bandas. Considerando os dois locos analisados na população, foram observados cinco padrões fenotípicos distintos, sendo quatro mostrado na Figura 5.

O sistema citosol aminopeptidase, em gel de poliacrilamida, pode ser usado na identificação de cultivares de mandioca, por apresentar fenótipos de baixa frequência na população, bem como, marcador para determinação de distância de fluxo gênico e identificação rotineira de variedades de mandioca. O loco “dominante” também foi observado por Faraldo (1999), avaliando etnovarietades de mandioca em eletroforese de isoenzimas em gel de amido de milho (penetrose 30 a 13%).

Lefèvre & Charrier (1993), estudando a herança genética de 17 locos isoenzimáticos em *M. esculenta*, apresentaram padrões isoenzimáticos diferentes dos observados no presente estudo para a CAP. Os autores encontraram apenas um loco gênico (*Amp-A*) com 2 alelos (A_1 e A_3). Esses autores consideraram o loco B como alelo do loco A, posicionamento diferente dos resultados encontrados no presente trabalho, pois a distância de migração entre os dois locos é o dobro da distância existente entre os alelos A_1 e A_2 (Figura 5).

Figura 5. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima citosol aminopeptidase (CAP), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de *M. esculenta*, com seus respectivos locos (A e B), alelos (A1, A2 e B) e valores de referência.

O suposto loco dominante apresenta baixa frequência, sendo encontrado em 21,42% das etnovariedades estudadas. Lefèvre & Charrier (1993) não detectaram o loco “dominante” em *M. esculenta*, no entanto, obtiveram fenótipo semelhante aos encontrados para as DG's: 70 e 41 da Figura 5, no híbrido resultante do cruzamento entre *M. esculenta* e *M. glasiiovii*. Então, fica a pergunta: será que no presente trabalho foi utilizado genótipo que tem introgressão genética com espécies silvestres do gênero *Manihot*? Essa questão deverá ser esclarecida no futuro. Como muitos dos genótipos estudados foram originados a partir de tribos indígenas localizadas em áreas que existem outras espécies do gênero *Manihot*, a introgressão é possível.

A CAP é um sistema promissor em estudos genéticos em mandioca, contudo não tolera congelamento a -20⁰C. A enzima em amostra congelada não é visualizada no gel, devendo ser utilizada a partir de extrato fresco para apresentar boa atividade. Entretanto, pode ser deixada por 48 horas em condição de geladeira (4⁰C) que não perde a atividade.

Na avaliação da enzima Glucose 6-fosfoglucoisomerase (GPI - E.C. 5.3.1.9), conhecida anteriormente como fosfohexose isomerase (PHI) e fosfoglucoisomerase (PGI), constatou-se atividade enzimática intensa no tecido estudado. Somente foi avaliado o loco *Gpi-1*, o qual apresentou indivíduos heterozigotos com três bandas, caracterizando o loco como dimérico (duas subunidades polipeptídicas). Foram avaliados três fenótipos distintos (Figura 6).

Figura 6. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima glucose 6-fosfato isomerase (GPI), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de *M. esculenta*, com o loco analisado (A), alelos (A1e A2) e valores de referência.

Lefèvre & Charier (1993) não obtiveram boa separação para esse loco e constataram que o gene que codifica esse loco da GPI está localizado nas organelas, informação não comprovada no presente trabalho, pois os indivíduos dentro da progênie apresentaram diferença em relação ao parental feminino.

A enzima Xiquimato desidrogenase (SKDH - E.C. 1.1.1.25), conhecida anteriormente com a sigla SDH, apresentou um loco enzimático, denominado de *Skdh-1*. O loco *Skdh-1* apresentou indivíduos heterozigotos com duas bandas, caracterizando o loco como monomérico (1 subunidade polipeptídica). Foram identificados quatro alelos e seis fenótipos diferentes, como pode ser observado na Figura 7.

A DG-197 foi o único material que apresentou o alelo 4. Esse material originado do Estado do Pará, apresenta características diferentes da espécie *M. esculenta*, como ausência de tuberização das raízes e características florais bem distintas.

Lefèvre & Charrier (1993) também constataram somente um único loco gênico, monomérico, com 4 alelos para a enzima SKDH. Embora Peroni (1998) tenha representado os alelos desse sistema enzimático em dois grupos A e B, devido ao alelo número 4 ter se mostrado inconstante no período das análises, o autor também detectou quatro alelos. Sambatti (1998), trabalhando com etnovariedades de mandioca originadas do Estado de São Paulo, encontrou cinco alelos nesse loco.

Borejevic (1990) e Hodgkin et al. (1993), citados por Cleveland et al. (1994), caracterizam a variação genética encontrada nos genótipos

Figura 7. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima Xiquimato desidrogenase (SKDH), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariiedades de *M. esculenta*, com seu loco (A), alelos (A1, A2, A3 e A4) e valores de referência.

provenientes de agricultura tradicional, pela presença de vários alelos por loco, resultando em elevados níveis de heterozigosidade. O loco *Skdh-1*, confirma o pressuposto dos autores anteriores.

Na avaliação da enzima Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH - E.C. 1.1.1.49), constatou-se a presença de um loco gênico, denominado de *G6pdh-1*. O loco *G6pdh-1* foi considerado como dimérico, apresentando quatro alelos, sendo que os alelos 2 e 4 foram constatados somente na DG – 197. O loco apresentou quatro fenótipos distintos; três fenótipos são mostrados na Figura 8.

Na avaliação da enzima Aspartato Aminotransferase (AAT- E.C. 2.6.1.1), anteriormente conhecida como glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), constatou-se a formação de dois locos, denominados de *Aat-1* e *Aat-2*. Os locos apresentaram quatro padrões fenotípicos diferentes (Figura 9). O loco *Aat-1* apresentou heterozigose na DG - 65, originada do Município de Anará, Estado de Roraima-RR, sendo um loco praticamente monomórfico.

Segundo Kephart (1990), estruturalmente essa enzima é formada por duas subunidades polipeptídicas (enzima dimérica), contudo no presente trabalho os locos comportaram-se como monoméricos (heterozigoto com duas bandas).

No presente trabalho, o sistema da aspartato aminotransferase (AAT) mostrou ser um sistema importante como marcador bioquímico na identificação de cultivares da mandioca (*M. esculenta*). Esse resultado está de acordo com as citações de Ramirez et al. (1987) que também reconheceram o sistema da GOT ou AAT como um marcador enzimático em potencial; entretanto, Borsoi

Figura 8. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), analisados em folhas recém-expandidas de 14 etnovariedades de *M. esculenta*, com seu loco (A), alelos (A1 e A3) e valores de referência.

Figura 9. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima Aspartato Aminotransferase (AAT), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de *M. esculenta*, com seus respectivos locos (A e B), alelos (A1, A2, B1 e B2) e valores de referência.

Filho (1995) não constatou variação dos padrões isoenzimáticos em cultivares de *M. esculenta* para essa enzima.

Na avaliação da enzima Glutamato desidrogenase (GTDH - E.C. 1.4.1.3), conhecida anteriormente pela sigla GDH, constatou-se um loco gênico, denominado de *Gtdh-1*, com três alelos e fenótipos distintos (Figura 10). O sistema isoenzimático apresentou padrões de bandas uniformes, onde todos os indivíduos amostrados apresentam-se em homozigose; não foi constatado indivíduos heterozigotos (indivíduos com duas ou mais bandas). O padrão de bandas apresentado pelo indivíduo é preservado em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, podendo ser um ótimo marcador bioquímico na caracterização de germoplasma.

A falta de expressão do heterozigoto não está relacionado a fatores genéticos. Frieden (1963) e Hernandez-Juviel et al. (1993) têm relatado mudança na mobilidade dessa enzima em extrato de fígado de bovino e cobra cascavel, respectivamente, como uma função da variação da diluição da enzima. O efeito de diluição ocorre em decorrência das moléculas de GTDH associarem-se umas as outras na presença de coenzimas e nucleotídeos purinicos.

A análise genética foi realizada considerando a segregação na progênie, onde os indivíduos que apresentavam o alelo diferente do parental feminino foi considerado de cruzamento.

Na avaliação da enzima Fosfatase ácida (ACP - E.C. 3.1.3.2), constatou-se grande atividade enzimática no tecido foliar, sugerindo alto o nível dessa

Figura 10. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima glutamato desidrogenase (GTDH), analisados em folhas recém-expandidas de 14 etnovariiedades de *M. esculenta*, com seu loco (A), alelos (A1, A2 e A3) e valores de referência.

enzima em folhas de mandioca. Foi avaliado somente um loco, denominado de *Acp-1*. O loco *Acp-1* apresentou indivíduos heterozigotos com duas bandas, caracterizando o loco como monomérico (uma subunidade polipeptídica). Foram identificados três fenótipos distintos, sendo dois mostrados na Figura 11.

Na avaliação da enzima Catalase (CAT – E.C. 1.11.1.6) constatou-se a formação de um loco, denominado de *Cat-1*. O loco *Cat-1* apresentou indivíduos heterozigotos com cinco bandas, caracterizando o loco como tetramérico (quatro subunidades polipeptídicas). A enzima não apresentou padrão eletroforético bem definido, possivelmente em decorrência da idade das plantas, pois a Catalase é uma enzima muito ativa nas raízes e plantas jovens.

O loco *Cat-1* enzimático não foi utilizado na determinação do fluxo gênico, justamente pela dificuldade de avaliação do padrão eletroforético das plantas adultas.

Hussain et al. (1987) e Ramirez et al. (1987) sugerem o sistema das esterases em gel de poliacrilamida como um marcador molecular para identificação de variedades de mandioca. Os autores mostram ser a esterase um grupo complexo de isoenzimas que apresenta ampla variabilidade na zona de migração mais rápida e apresentam pouca variação observada entre os diferentes tecidos analisados no material estudado. O protocolo utilizado pelos autores foi testado, contudo não apresentou resultado satisfatório, possivelmente em decorrência de terem utilizado plantas com dois meses de idade e, neste trabalho, foram utilizados genótipos com essa idade (progênes) e outras com mais idade.

Figura 11. Fotografia do gel e zimograma do padrão eletroforético dos fenótipos apresentados pela enzima Fosfatase Ácida (ACP), analisados em folhas recém-expandidas de 15 etnovariedades de *M. esculenta*, com o locos (A), alelos (A1 e A2) e valores de referência.

No laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada do Departamento de Genética da ESALQ-USP foi estabelecido protocolo para eletroforese de proteínas para isoenzimas em gel de amido de milho (penetrose 30) em mandioca (*M. esculenta* Crantz), como pode ser verificado em Faraldo (1994; 1999), Peroni (1998), Sambatti (1998) e, no presente trabalho, em gel de poliacrilamida em gradiente. O domínio dos protocolos dessas técnicas possibilitará a realização de trabalhos com *M. esculenta* e a avaliar a relação filogenética entre *M. esculenta* e as espécies silvestres do gênero *Manihot*.

4.3 Determinação do Sistema Reprodutivo

4.3.1 Aderência dos dados ao modelo Multilocos

A avaliação de aderência dos locos estudados ao modelo multilocos foi realizada por meio do teste de Qui-quadrado (χ^2). O teste de χ^2 revelou diferenças não significativas ($P < 0,05$) para a metade dos locos analisados e pequenas diferenças significativas para os demais locos para as frequências alélicas encontradas nos óvulos e dos grãos de pólen, indicando que os locos se adequaram ao modelo de cruzamento misto proposto por Ritland & Jain (1981) (Tabela 3). Observa-se, em todos os locos, que as frequências dos alelos dos grãos de pólen e óvulos apresentam contribuição similar para a descendência; portanto, não está havendo cruzamentos preferenciais dentro da

Tabela 3: Teste de χ^2 para aderência dos locos ao modelo multilocos, estimativas das frequências alélicas, desvios-padrão dos óvulos e grãos de pólen contribuintes para o conjunto gênico de *M. esculenta* Crantz. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.

Loco	Número de progênie	Número de indivíduos	Alelo	Frequência do alelo no pólen	Frequência do alelo no óvulo (D.P.)	χ^2
<i>Cap-1</i>	8	113	1	0,646 (0,05)	0,563 (0,132)	3,26ns
			2	0,354 (0,05)	0,437 (0,157)	
<i>Gpi-1</i>	7	101	1	0,650 (0,09)	0,813 (0,100)	13,66**
			2	0,350 (0,09)	0,188 (0,106)	
<i>Skdh-1</i>	8	113	1	0,381 (0,10)	0,250 (0,089)	12,66**
			2	0,593 (0,09)	0,625 (0,140)	
			3	0,026 (0,01)	0,125 (0,068)	
<i>G6pdh-1</i>	8	113	1	0,641 (0,05)	0,625 (0,112)	0,12ns
			2	0,355 (0,05)	0,375 (0,112)	
<i>Aat-1</i>	5	56	1	0,464 (0,097)	0,375 (0,181)	1,82ns
			2	0,536 (0,097)	0,625 (0,181)	
<i>Gtdh-1</i>	8	113	1	0,379 (0,109)	0,375 (0,167)	12,66**
			2	0,501 (0,086)	0,375 (0,161)	
			3	0,120 (0,056)	0,250 (0,149)	
<i>Acp-1</i>	7	98	1	0,495 (0,075)	0,625 (0,184)	6,72*
			2	0,505 (0,075)	0,375 (0,184)	
<i>Cat-1</i>	1	13	1	0,769 (0,129)	0,625 (0,206)	1,28ns
			2	0,231 (0,129)	0,375 (0,206)	

ns: Não significativo.

*: Significativo ao nível de 5%.

**: Significativo ao nível de 1%.

população. Se o material utilizado no presente trabalho fosse de uma população natural poder-se-ia dizer que as matrizes que deram origem às progênes avaliadas eram representativas da população.

4.3.2 Taxa de Cruzamento

A caracterização da taxa de cruzamento na população (roça) foi abordada a partir da taxa de cruzamento uniloco (t_s) e multilocos (t_m). A t_s e t_m foram obtidas a partir da estimativa da verossimilhança (Ritland & Jain, 1981), pelo programa MLTR de Ritland (1996). Em populações naturais a diferença entre t_m e t_s indica cruzamentos entre aparentados (Ritland, 1996; Ritland & El-Kassaby, 1985 e Shaw & Allard, 1982) e a diferença positiva entre t_m e 1,0 fornece a taxa de autofertilização da população (Ritland, 1996).

O modelo multilocos permite obter a proporção de cruzamentos endogâmicos devido à t_s ser obtida loco a loco, por meio das informações das frequências gênicas de pólen e óvulos. A estimativa multilocos calcula a taxa de cruzamento considerando, simultaneamente, vários locos. A estimativa multilocos tem mais recursos para separar sementes originadas de cruzamentos daquelas de autofertilização, pois os casos duvidosos de um loco são esclarecidos por outros locos. A taxa uniloco confunde, muitas vezes, cruzamentos entre aparentados com autofertilização e/ou apomixia e, nesses casos, subestima a taxa de cruzamento e superestima a taxa de autofertilização.

A estimativa t_m foi obtida a partir das oito matrizes analisadas. A t_m é uma estimativa que considera todos os locos nas probabilidades de cruzamentos, portanto mais próxima do que ocorre na natureza. A t_m estimada foi de 0,91 (0,04), revelando que 91,5% das plantas foram geradas por cruzamentos (Tabela 4).

As estimativas t_s dos locos variou de 0,57 (*Acp-1*) a 0,99 (*G6pd-1*), com média de 0,75. O baixo valor do desvio padrão de t_s (0,06) é devido a estimativa ter sido obtida a partir de grande número de locos (8), pois estimativas de variâncias obtidas a partir de poucos dados tendem a aumentar o erro padrão da média (Tabela 4).

A diferença entre t_m e t_s foi de 0,16 (0,04) e a diferença entre t_m e 1,0 foi de 0,085. As taxas de cruzamento obtidas mostram que, neste período de reprodução, 91,5% das plantas foram geradas por cruzamentos, sendo: 75,3% entre indivíduos não aparentados, 16,2% entre indivíduos que apresentam grau de parentesco ou apresentam genótipos comuns e 8,5% por autofertilização.

A alta taxa de cruzamento para a mandioca encontrada no presente trabalho corrobora os resultados obtidos por Murawski & Hamrick (1991) avaliando o sistema reprodutivo de nove espécies tropicais, Murawski & Hamrick (1992) em *Cavanillesia platanifolia* e O'Malley et al., (1988) em castanheira do Brasil (*Bertholletia excelsa*), de que as espécies arbóreas das florestas tropicais são predominantemente ou completamente de fertilização cruzada.

Tabela 4: Estimativas da taxa de cruzamento multilocos (t_m) populacional, taxa de cruzamento uniloco (t_s), número de progênies analisadas, número de indivíduos analisados para os locos isoenzimáticos estudados em *M. esculenta* Crantz. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.

Locos	Número de Progênies	Número de indivíduos	Estimativa Multilocos (t_m)	Estimativa uniloco (t_s)	Diferença ($t_m - t_s$)
<i>Cap-1</i>	8	113		0,787 (0,087) ¹	
<i>Gpi-1</i>	7	101		0,761 (0,157)	
<i>Skdh-1</i>	8	113		0,621 (0,273)	
<i>G6pdh-1</i>	8	113		0,994 (0,005)	
<i>Aat-1</i>	5	56		0,682 (0,107)	
<i>Gtdh-1</i>	8	113		0,668 (0,14)	
<i>Acp-1</i>	7	98		0,579 (0,05)	
<i>Cat-1</i>	1	13		0,920 (0,00)	
População			0,915 (0,04)	0,750 (0,06)	0,162 (0,04)

¹: O número entre parênteses se refere ao desvio padrão.

A alta taxa de cruzamento (91,5%) constatada para as matrizes de mandioca no presente trabalho é, possivelmente, provocada pela dicogamia protogínica que a espécie apresenta (Figura 12a e b) e pelo isolamento reprodutivo causado por diferentes épocas de florescimento em algumas etnovariedades estudadas. A porcentagem de autofertilização variou de 4,0% a 13,0%, decorrente do pequeno período de sincronia entre a abertura das flores masculinas e femininas entre inflorescências dentro da planta. Segundo Lloyd & Webb (1986), a dicogamia pode ser classificada em *completa* quando não existe sobreposição no período de maturação dos órgãos reprodutivos e *incompleta* quando existe sobreposição, como é o caso da mandioca.

Como a mandioca é uma planta polinizada por abelhas e podendo ocorrer cruzamentos entre as plantas mais próximas, caso o experimento em que foram coletados os dados do presente trabalho tivesse sido implantado com repetições de um mesmo genótipo, provavelmente ocorreria um aumento na taxa de autofertilização.

A forma como o experimento foi instalado favorece os cruzamentos, pois existe somente uma planta, para que ocorra a autofertilização. Nas roças tradicionais existem várias cópias de um mesmo genótipo, o que certamente provoca polinização entre indivíduos com o mesmo genótipo (gueitonogamia), proporcionando aumento da taxa de endogamia, como demonstrado por Ritland & El-Kassaby (1985) em pomar de sementes de pinheiro (*Pseudotsuga menziesii* var. "glauca").

Figura 12. Dicogamia protogínica em mandioca. a: flores femininas abertas e flores masculinas em fase de botão floral; b: flores masculinas desenvolvidas e flores femininas em estágio de fruto em desenvolvimento. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997.

Pereira et al. (1978), trabalhando com dois marcadores genéticos morfológicos, constataram que a espécie apresenta porcentagem de polinização cruzada de 63% e 100% para os dois caracteres analisados. O resultado para taxa de cruzamento estimada, no presente trabalho, corrobora a amplitude da taxa de cruzamento encontrada por Pereira et al. (1978). Entretanto, a determinação da taxa de cruzamento realizada por caracteres morfológicos apresenta a desvantagem de ser obtida por meio de poucos locos gênicos. No trabalho de Pereira et al. (1978), se for retirado uma média dos dois caracteres analisados, a mandioca poderá ser considerada uma espécie de cruzamento misto. A determinação da taxa de cruzamento deve ser realizada a partir de muitos locos, genótipos e ambientes para que seja obtida estimativa mais próximo do que ocorre na natureza.

A taxa de cruzamento multilocos (t_m) estimada por matriz variou de 69% (DG – 128) a 100% (DG's: 61, 62, 118 e 139) (Tabela 5). A discrepância nas taxas de cruzamentos dos materiais estudados, pode ser decorrente da forma de florescimento da matriz. A DG – 128, a qual apresentou menor t_m , tem florescimento do tipo *Big bang*, ou seja, grande concentração de flores abertas num curto período de tempo (aproximadamente um mês), em quanto as demais apresentam florescimento mais espaçado ao longo do ano (aproximadamente seis meses).

A autofertilização forçada que ocorre dentro das roças, ao longo do tempo, pode ser a responsável pela “purificação genética”, proporcionando,

Tabela 5: Estimativas da taxa de cruzamento multilocos (t_m) e número de indivíduos estudados para as oito matrizes de *M. esculenta* Crantz estudadas. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.

Genótipos	Número de indivíduos	t_m
DG – 55	19	0,93 (0,13) ¹
DG – 61	12	1,00 (0,00)
DG – 62	13	1,00 (0,05)
DG – 118	13	1,00 (0,00)
DG – 125	13	0,97 (0,06)
DG – 128	15	0,69 (0,13)
DG – 139	12	1,00 (0,00)
Mantiqueira	16	0,84 (0,14)

¹: O número entre parênteses se refere ao desvio padrão.

dessa forma, suporte à autofertilização, em alguns genótipos da mandioca cultivada, bem como a fertilização cruzada.

4.4 Quantificação da movimentação do pólen

4.4.1 Diversidade genética na roça experimental

Na Figura 13, observa-se o resultado da análise da técnica de agrupamento, fundamentado no padrão eletroforético dos 56 acessos que formam a roça experimental. O padrão eletroforético, baseado em sete sistemas isoenzimáticos, nos quais obteve-se 20 marcas polimórficas (Apêndice 4), demonstrou o grande poder de separação eletroforético apresentado pela técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida em gradiente e/ou a grande variabilidade existente no material analisado, pois praticamente todos os indivíduos foram distinguidos.

As etnovariedades DG's: 117 e 118 e DG's: 43 e 51 apresentaram o mesmo padrão fenotípico, respectivamente. Portanto, somente nestes dois casos os locos analisados não foram capazes de distinguir os genótipos estudados. As DG's: 117 e 118, foram coletadas na mesma roça da Comunidade São João, no Município de Guarabira, Estado do Amazonas-AM, podendo ser o mesmo material. A DG - 43 é chamada como "Pretinha" e utilizada para fazer farinha pelos caboclos da Comunidade Marará, Município de Barcelos, do Estado do Amazonas-AM, enquanto a DG - 51 também, é chamada como "Pretinha" e utilizada para fazer farinha pelos caboclos do

Figura 13: Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 56 etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta*), fundamentado na matriz de similaridade genética obtida pelo coeficiente de Jaccard e algoritmo de ligação U.P.G.M. A.

Município de Carvoeiro, do Estado do Amazonas-AM; portanto, também pode ser o mesmo material, o qual foi levado de um município para o outro, pois os dois municípios estão localizados às margens do rio Negro – Estado do Amazonas.

A DG – 197 é um genótipo originado do Estado do Pará-PA, denominado pelos caboclos regionais como “Mandiocaba”, cujas folhas são utilizadas na preparação da comida típica denominada de “Maniçoba”. A referida comida é, tradicionalmente, preparada com as folhas de mandioca; como a mandicaba apresenta grande quantidade de folhas, então ela é utilizada. Na Figura 13, observa-se que o padrão eletroforético desse material é muito diferente dos demais indivíduos da espécie *M. esculenta*; portanto, esse material parece ser resultante de introgressão genética com outras espécie do gênero *Manihot* ou até mesmo ser outra espécie. Além do padrão eletroforético, essa etnovarietade apresenta características diferentes em relação a *M. esculenta*, como ausência de tuberização das raízes e flores de maior tamanho.

4.4.2 Distância do parental masculino

A determinação da paternidade foi possível graças a grande diversidade mostrada pelos genótipos que formam a roça experimental. Dessa forma, com base no padrão eletroforético da planta mãe e da descendência foi possível identificar o parental masculino.

Dos 104 indivíduos avaliados, em 40 (38,46%) foi possível identificar um único genótipo como parental masculino do indivíduo investigado (Tabela 6). A determinação do parental masculino entre os 56 genótipos que formam a roça experimental variou de 1 a 7 genótipos (caso do indivíduo número 12 da progênie da DG – 55). A variação na distinção do número de possíveis parentais ocorreu em decorrência da característica de cada indivíduo, ou seja, a distinção do indivíduo que apresenta padrão genotípico comum entre os genótipos que formam a roça experimental é mais difícil; entretanto para o indivíduo que apresenta padrão genotípico raro, a determinação do parental é facilitada. Outro fator que dificultou a determinação do parental masculino foi a eliminação de alguns locos para alguns indivíduos analisados, a exemplo da DG – 128, dificultando a identificação do parental masculino dos indivíduos da progênie dessa matriz.

As DG's: 52, 132 e 133 não foram utilizadas nas análises. As duas primeiras etnovariedades não completaram o desenvolvimento vegetativo, enquanto a última etnovarietade não floresceu.

O programa de determinação de paternidade (PATER) foi muito útil na operacionalização das análises, pois além de evitar o grande trabalho de avaliação dos resultados manualmente, proporcionou resultados com menor possibilidade de erro.

O PATER foi elaborado com dois objetivos fundamentais: o primeiro, a determinação de paternidade pode ser realizada com locos de herança codominante, dominante e a combinação dos dois tipos de herança. A

Tabela 6: Distância do parental masculino e número de frutos analisados em oito genótipos de *M. esculenta* Crantz. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.

Identificação das plantas avaliadas	Número do Frutos	Etnovariedades	Distância do Parental masculino (m)	Parental masculino
1	1	DG – 55	-	67 ou 69
2	1	DG – 55	-	44, 117 ou 118
3	1	DG – 55	10,77	134
4	2	DG – 55	8,94	128
5	2	DG – 55	-	23 ou 121
6	2	DG – 55	11,66	113
7	3	DG – 55	11,66	113
8	3	DG – 55	-	67 ou 69
9	3	DG – 55	-	47, 54 ou 116
10	4	DG – 55	-	42, 50 ou 133
11	5	DG – 55	-	47, 54, 56 ou 116
12	5	DG – 55	-	43, 44, 47, 51, 111, 115 ou 116
13	6	DG – 55	-	55, 56, 128, 130, 131 ou 132
14	7	DG – 55	-	55, 56, 128, 131 ou 132
15	7	DG – 55	-	55, 130 ou 132
16	8	DG – 55	0	55 ou 132
17	8	DG – 55	-	55, 130 ou 132
18	9	DG – 55	-	55, 56, 130 ou 132
19	1	DG – 61	-	113 ou 121
20	1	DG – 61	-	23 ou 121
21	1	DG – 61	-	39, 65, 68 ou 126
22	2	DG – 61	-	67 ou 69
23	2	DG – 61	-	55, 56, 128, 131 ou 132
23	2	DG – 61	-	55, 56, 128, 131 ou 132
25	3	DG – 61	10,19	115
26	3	DG – 61	6,32	48
27	4	DG – 61	6,32	139
28	5	DG – 61	8,89	121
29	1	DG – 62	14,42	113
30	1	DG – 62	10,00	126
31	1	DG – 62	10,00	70
32	2	DG – 62	10,00	70
33	2	DG – 62	10,00	70
34	3	DG – 62	14,14	17
35	3	DG – 62	10,00	70
36	3	DG – 62	12,00	127
37	4	DG – 62	-	49, 59 ou 70
38	5	DG – 62	-	70 ou 127
39	5	DG – 62	-	70 ou 127
40	6	DG – 62	-	70 ou 127
41	1	DG – 118	-	44, 115, ou 116
42	1	DG – 118	4,47	69
43	1	DG – 118	4,47	113
44	2	DG – 118	4,47	23
45	2	DG – 118	4,47	23
46	2	DG – 118	4,47	23
47	3	DG – 118	2,00	138
48	3	DG – 118	2,82	116
49	4	DG – 118	10,00	130

Identificação das plantas avaliadas	Número do Frutos	Etnovariedades	Distância do Parental masculino (m)	Parental masculino
50	4	DG - 118	8,94	44
51	5	DG - 118	8,24	121
52	6	DG - 118	-	55, 56, 113, 128, 131 ou 132
53	7	DG - 118	8,24	121
54	1	DG - 125	4,47	70
55	1	DG - 125	4,47	70
56	1	DG - 125	4,47	70
57	2	DG - 125	-	47, 54 ou 116
58	2	DG - 125	-	54 ou 116
59	2	DG - 125	4,47	116
60	3	DG - 125	-	70, 127 ou 129
61	3	DG - 125	4,47	116
62	4	DG - 125	-	48, 70 ou 127
63	5	DG - 125	-	44, 113 ou 116
64	5	DG - 125	-	70 ou 125
65	6	DG - 125	8,94	52 ou 121
66	7	DG - 125	-	120 ou 138
67	1	DG - 128	-	55, 113 ou 132
68	2	DG - 128	-	38, 45, 129 ou 137
69	2	DG - 128	-	38, 45, 129, 134 ou 137
70	3	DG - 128	-	23., 121 ou 133
71	4	DG - 128	-	55, 113 ou 132
72	5	DG - 128	-	44, 56, 117, 118 ou 128
73	6	DG - 128	-	128 ou 131
74	7	DG - 128	-	55, 113, 130 ou 132
75	8	DG - 128	-	55, 56, 128 ou 132
76	9	DG - 128	-	55, 56, 128, 131 ou 132
77	10	DG - 128	-	44, 56, 117 ou 118
78	11	DG - 128	-	55, 113, 130 ou 132
79	12	DG - 128	-	38, 45, 129 ou 134
80	12	DG - 128	-	55, 113 ou 132
81	13	DG - 128	-	38, 45, 129 ou 137
82	1	DG - 139	-	23 ou 121
83	1	DG - 139	-	52, 70 ou 127
84	1	DG - 139	4,00	23
85	2	DG - 139	-	49, 59, 61, 120 ou 138
86	2	DG - 139	-	49, 59, 120 ou 138
87	3	DG - 139	-	61, 120 ou 138
88	4	DG - 139	4,00	23
89	1	DG - 137	-	73, 121 ou 125
90	2	DG - 137	-	47 ou 116
91	3	DG - 137	5,65	55 ou 132
92	4	DG - 137	-	38, 45, 129, 134 ou 137
93	4	DG - 137	-	119 ou 126
94	5	DG - 137	-	48 ou 50
95	6	DG - 137	-	70, 123 ou 138
96	7	DG - 137	-	38, 45, 129, 134 ou 137
97	7	DG - 137	-	38, 129
98	8	DG - 137	-	60, 67, 69, 121 ou 133
99	9	DG - 137	-	70 ou 127
100	9	DG - 137	5,65	55 ou 132
101	10	DG - 137	-	38, 45, 129 ou 137
102	11	DG - 137	-	38, 45, 129 ou 137
103	12	DG - 137	4,00	125
104	13	DG - 137	4,47	73
Média	-	-	7,17	-

determinação da paternidade pode ser realizada a partir de dados obtidos com marcadores moleculares do tipo dominante (RAPD e AFLP), assim como os codominantes (isoenzimas, RFLP e microsátélites) ou a combinação dos dois tipos de marcadores; e o segundo, o programa faz a determinação da paternidade e não a exclusão de paternidade entre os indivíduos possíveis.

O programa avalia todos os locos; caso exista um alelo nulo ou até mesmo um dado errado, o indivíduo portador desse alelo não será excluído da análise. Considerando que o dado perdido foi justamente no parental verdadeiro, no final da análise esse indivíduo apresentará valor inferior a 100% de probabilidade de ser o parental verdadeiro, contudo apresentará valor maior ou no máximo igual aos demais candidatos, dependendo do número de locos analisados. Quanto maior o número de locos analisados, mais fácil é a determinação da paternidade e existe menor probabilidade de erro nos resultados.

Para que o resultado da análise realizada com o PATER esteja errada é necessário retirar uma banda (alelo) do parental verdadeiro e atribuir um alelo no parental que apresenta frequência alélica semelhante ao parental verdadeiro. Portanto, as análises realizadas por meio do programa proporcionaram segurança nos resultados obtidos.

Na Tabela 6, constata-se que o indivíduo 3 é resultante do cruzamento entre a DG – 55, originada do Estado do Amazonas-AM e a DG – 134, originada do Estado de São Paulo-SP, assim como o indivíduo 84 é resultante do cruzamento entre a DG – 139, originada do Estado do Pará-PA e a DG – 23,

originada do Estado de São Paulo-SP. Portanto, existe fluxo gênico entre as etnovariedades das diferentes regiões geográficas no experimento realizado em Piracicaba-SP, apesar do isolamento geográfico entre estas etnovariedades da Amazônia e São Paulo.

Na Figura 14 observa-se a distribuição dos 40 genótipos em relação à distância de migração dos grãos de pólen para realização dos cruzamentos com as matrizes selecionadas. A distância do parental masculino variou de 0 (autofertilização) a 14,42 m, com média de 7,17 m (Tabela 6). A maximização dos cruzamentos em mandioca apresenta tendência de decréscimo de cruzamentos a cada intervalo de distanciamento do centro de dispersão de pólen.

Os himenópteros são os principais frequentadores da flor da mandioca, sendo a abelha (*Apis mellifera*) considerada o principal polinizador. As abelhas procuram as flores em busca de pólen e néctar. O inseto utiliza o estigma da flor feminina como “pista de pouso” e ao apoiar-se nas patas traseiras atingem o néctar localizado na base da flor, próximo ao disco estaminal, promovendo contato entre os grãos de pólen aderidos ao seu corpo com o estigma. Para coletar o néctar, as abelhas contornam toda a flor, depositando pólen nos três lóbulos do estigma. Portanto, caracteriza-se uma perfeita interação entre o polinizador e a flor da mandioca. Constatou-se que a abelha pode ser considerada o eficiente polinizador da flor da mandioca, pois 94,8% das flores avaliadas foram polinizadas. Esse resultado corrobora o pressuposto de

Figura 14: Relação entre o número de indivíduos doadores de pólen e a distância de dispersão em relação ao centro de recebimento dos grãos de pólen em oito genótipos de mandioca (*Manihot esculenta*).

Roger & Apan (1973), quando classificaram as abelhas como os principais polinizadores do gênero *Manihot*.

O padrão de dispersão efetiva dos grãos de pólen encontrado no presente trabalho é característico de plantas cuja dispersão do pólen é feita por abelhas (*Apis mellifera*), como é o caso de mandioca.

A dispersão do pólen por meio da abelha obedeceu a uma distribuição leptocúrtica (distribuição que tem um pico relativamente alto). A leptocurtose da distribuição zoófila do pólen é composta pelo agrupamento de distribuição aleatória das plantas, assim como pelo padrão de inflorescência da maioria das plantas visitadas. Além das características das plantas visitadas, cerca de 95% dos vôos das abelhas são efetuados entre plantas localizadas a pequenas distâncias, com o objetivo de fugir de predadores ou retornar a colméia, reforçando a hipótese de distribuição leptocúrtica (Richards, 1997).

A curva leptocúrtica encontrada no presente trabalho, não apresenta os maiores valores de polinização logo nas primeiras plantas, como constatado para *Hibiscus cannabinus* (Datta et al., 1982), juta *Corchorus olitorius* (Maiti et al., 1981) e Moresco (1999) trabalhando com algodão (*Gossypium* spp.), justamente porque não foi utilizado uma variedade ou cultivar específica, cujo padrão de florescimento é uniforme. Os genótipos avaliados apresentam fenologias completamente diferentes, são materiais coletados em locais completamente diferentes, apresentando padrão de florescimento também diferenciado. A DG – 128 e 130 apresentam florescimento em forma de *big bang*, grande concentração de abertura de flores num curto período de tempo,

enquanto as DG's: 55, 139, 62 e a variedade Mantiqueira apresentam florescimento distribuído ao longo do ano. Como as abelhas procuram as flores mais próximas, e as plantas que têm mais flores abertas, se as plantas mais próximas não estão florescendo então as abelhas vão até as mais distantes, dessa forma causando essa curtose (grau de achatamento de uma distribuição normal) na distribuição dos cruzamentos na roça experimental.

4.5 Determinação da Paternidade dentro dos frutos

A determinação da paternidade dentro do fruto foi realizada em 27 frutos, sendo 15 com duas sementes e 12 com três sementes (Tabela 7). Foi constatado que em 60% dos frutos com duas sementes e 90,9 % de frutos com três sementes foi possível determinar a paternidade das plantas de cada fruto. Nas plantas oriundas de frutos com duas sementes, 88,89% eram meio-irmãs e 11,11% eram irmãs completas. Em plantas oriundas de frutos com três sementes, 81,81% eram meio-irmãs e 18,19% eram irmãs completas. Portanto, em frutos de mandioca com mais de uma semente existe grande probabilidade das plantas resultantes apresentarem mais de um parental masculino.

A combinação entre plantas meio-irmãs e irmãs completas dentro de fruto não foi detectado, devendo estar entre os frutos, cujos parentais não foram possíveis de serem diferenciados (40% e 8,33% em frutos com duas e três sementes, respectivamente). A combinação dos dois tipos de progênes no mesmo fruto é inferior a quantidade de meio-irmãs, pois se todos os indivíduos

Tabela 7: Grau de Parentesco em plantas resultantes de frutos com duas e três sementes de *M. esculenta* Crantz. Piracicaba, ESALQ/USP, 2000.

Fruto	Número de Frutos	Número de Plantas	Plantas Meio-irmãs	Plantas (Irmãs Completas)
2S*	15	9 (60,00)**	8 (88,89)	1 (11,11)
3S	12	11 (91,67)	9 (81,81)	2 (18,19)

*2S e 3S: Frutos com duas e três sementes, respectivamente.

** Os valores entre parênteses são percentuais.

que não foram possíveis de distinção apresentassem a combinação dos dois tipos de progênes, não superaria a classe dos meios-irmãos encontrado.

Os resultados encontrados no presente trabalho constataam que os marcadores isoenzimáticos apresentam variabilidade, a qual possibilita a exclusão de parentesco entre plantas de mandioca. O grande polimorfismo encontrado entre as etnovariedades que formam a roça experimental facilitou a exclusão de parentesco. Para a determinação de paternidade em populações naturais, seria necessário aumentar o número de locos analisados, para obter a distinção entre os indivíduos que formam a progênie.

A múltipla paternidade encontrada para os frutos de mandioca corrobora o encontrado para as espécies polinizadas por insetos por Campbell (1998), Morgan & Barrett (1990), Muoma et al. (1991), Schoen & Clegg, (1984) e Yates et al. (1998). A múltipla paternidade nas espécies polinizadas por insetos é tão comum que levou Morgan & Barrett (1990) a sugerir que a múltipla paternidade dentro de um fruto pode ser considerado um fenômeno geral nas plantas polinizadas por animais.

A múltipla paternidade em frutos de mandioca, possivelmente é resultante da mistura de grãos de pólen no polinizador. As abelhas não escolhem os grãos de pólen que depositam nas flores; entretanto, a planta pode selecionar os grãos de pólen que apresentam a melhor contribuição genética para a formação da progênie. Como não foi encontrado fruto com a mistura de plantas meio-irmãs e irmãs completas, isto significa que a espécie pode apresentar incompatibilidade críptica. O sistema de incompatibilidade críptica é

o retardamento do crescimento dos tubos polínicos dos grãos de pólen da própria planta quando existem grãos de pólen estrangeiros competindo para fertilização (Bateman, 1956). Assim como, pode estar ocorrendo também aborto seletivo dos embriões formados por autofertilização, sobrevivendo somente plantas resultantes de cruzamento. Sorensen (1979), trabalhando com pinheiro (*Pseudo menziesi* var. “glauca”), constatou esse tipo de depressão endogâmica. A depressão endogâmica foi constatada em mandioca em nível diferenciado entre as cultivares avaliadas por Kawano et al. (1978). Estas questões precisam ser esclarecidas em trabalhos, no futuro.

A mandioca é uma espécie que facilita a avaliação do sistema de incompatibilidade críptica, pois apresenta o estigma grande e dividido em três lóbulos, facilitando as polinizações manuais.

Portanto, após a abordagem desses três parâmetros populacionais (sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade dentro do fruto), os quais influenciam a estrutura genética das populações das roças de etnovariedades, constata-se a existência de recombinação genética por meio da polinização cruzada dentro de roça de etnovariedades de mandioca, conforme o pressuposto no modelo de dinâmica evolutiva desenvolvido por Cury (1993) e ampliado pelo Prof. Paulo Sodero Martins.

5. CONCLUSÕES

- Em mandioca, os frutos geralmente têm duas ou três sementes. Frutos com uma só semente são menos frequentes. Sementes originadas de frutos com uma só semente têm maior taxa de germinação.
- A técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de poliacrilamida em gradiente mostrou-se eficiente para a determinação do sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade nos frutos de mandioca.
- Foram encontrados indícios de loco dominante para a enzima Citosol Aminopectidase (CAP).
- Foram encontrados indícios de que a DG – 197, denominada de Mandiocaba, não pertence a espécie *Manihot esculenta*.
- O alto valor encontrado para a taxa de cruzamento multilocos (91,5%) indica que as etnovariedades avaliadas apresentam a forma alógama para o sistema reprodutivo.
- O programa de computador PATER (*Paternity Program*) mostrou-se eficiente na determinação da paternidade das plantas de mandioca.

- Existe fluxo gênico, via grão de pólen, entre as etnovariedades de mandioca originadas de diferentes regiões geográficas, conforme observado em experimento realizado em Piracicaba-SP.
- O fluxo gênico efetivo encontrado variou desde 0 (autofertilização) a 14,42 m, com média de 7,17m. A distribuição avaliada é característica de plantas polinizadas por abelhas.
- As plantas oriundas de frutos de mandioca que apresentam duas ou três sementes apresentam, geralmente, mais de um parental masculino.
- Os resultados encontrados no presente trabalho confirmam a ocorrência de polinização cruzada dentro de roça, conforme pressuposto no modelo de dinâmica evolutiva desenvolvido para a espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essência florestais**. Viçosa: UFV/SIF, 1991. 242p.
- ALLEM, A.C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.41, p.133-150, 1994.
- ALLEM, A.C. A reappraisal on the geographical origin of cassava *Manihot esculenta*, Euphorbiaceae). In: ANAIS DO SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: IAC/EMBRAPA-CENARGEN, 1997. p.86-87.
- ALLEM, A.C.; GOEDERT, C.O. Formação da base genética e manejo dos recursos genéticos de mandioca: o caso do Brasil. In: HERSHEY, C.H. (Ed.) **Mejoramiento Genético de la Yuca en América Latina**. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, 1991. Cap.9, p.125-161.
- ASHLEY, M.V.; DOW, B.D. The use of microsatellites for genetic of natural populations. In: SCHIERWATER, B.; STREIT, B.; WAGNER, G.P.; et al. (Eds.) **Molecular ecology and evolution: approaches and applications**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1994. p.185-201.

- AZIZ, Z.A. Observations on the effect of low temperatures on floral induction in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **MARDI Research Bulletin**, v.12, n.1, p.102-106, 1984.
- BARRETT, S.C.H.; ECKERT, C.G. Variation and evolution of mating systems in seed plants. In: KAWANO, S., ed. **Biological approaches and evolutionary trends in plants**. London: Academic Press, 1990. p.169-92.
- BATEMAN, A.J. Cryptic self-incompatibility in the wallflower: *Cheiranthus Cheiri* L. **Heredity**, v.10, p.257-261, 1956.
- BAWA, K.S.; O'MALLEY, D.M. Estudios genéticos y de sistemas de cruzamiento en algunas especies arbóreas de bosques tropicales. **Revista de Biología Tropical**, 35(Supl. 1), p.177-188, 1987.
- BORSOI FILHO, J.L. Variabilidade isoenzimática e divergência genética de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Viçosa, 1995. 52p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
- BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.52, p.145-157, 1978.
- BROWN, A.H.D. Genetic characterization of plant mating systems. In: BROWN, A. H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S., ed. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p.145-162.
- BROWN, A.H.D.; ALLARD, R.W. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphism. **Genetics**, v.66, p.133-145, 1970.

BROWN, A.H.D.; BARRETT, S.C.H.; MORAN, G.F. Mating system estimation in forest trees: models, methods and meanings. In: GREGORIUS, H. R. (Ed.) **Population Genetics in Forestry**. New York: Springer Verlag, 1985a. p.32-49.

BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J.; JAROSZ, A.M. Isozymes Analysis of Plant Mating Systems. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, D.E. (Ed.) **Isozymes in Plant Biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. Cap.3, p.73-86.

BROWN, A.H.D.; GRANT, J.E.; PULLEN, R. Outcrossing and paternity in *Glycine argyrea* by paired fruit analysis. **Biology Journal Linnean Society**, v.29, p.283-294, 1986.

BROWN, A.H.D.; MARSHALL, D.R. A basic sampling strategy: theory and practice. In: GUARINO, L.; RAO, V.R.; REID, R. (Eds.) **Colleting Plant Genetic Diversity Technical Guidelines**. Wallingford: CAB International, 1995. p.75-90.

CAMPBELL, D.R. Comparing pollen dispersal and gene flow in a natural population. **Evolution**, v.45, p.1965-1968, 1991.

CAMPBELL, D.R. Multiple paternity in frutis of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). **American Journal of Botany**, v.85, n.7, p.1022-1027, 1998.

CAPINPIN, J.M.; BRUCE, V.C. Floral biology and cytology of *Manihot utilissima*. **Philippine Agriculturist**, v.39, n.16, p.306-316, 1955.

- CHANDRARATINA, M.F.; NANAYAKKARA, K.D.S.S. Studies in cassava. II. The production of hybrids. **Tropical Agriculture**, v.194, p.59-74, 1948.
- CHAKRABORTY, R.; MEAGHER, T.R.; SMOUSE, P.E. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguos paternity. **Genetics**, v.118, p.527-536, 1988.
- CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; et al. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, v.383, p.398-399, 1996.
- CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v.30, p.814-848, 1980.
- CLEGG, M.T.; EPPERSON, B.K. Recent developments in population genetics. **Advances in Genetics**, v.23, p.235-269, 1985.
- CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; ALLARD, R.W. Estimation of life cycle components of selection in an experimental plant population. **Genetics**, v.89, p.765-792, 1978.
- CLEVELAND, D.A.; SOLERI, D.; SMITH, E.S. Do folk crop varieties have a role in Sustainable Agriculture? **BioScience**, v.44, p.740-751, 1994.
- CREPALDI, C.I. Biologia da reprodução em *Manihot* Mill. Campinas, 1987. 160p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Campinas.
- CURY, R. Dinâmica evolutiva e caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), na agricultura autóctone do Sul do Estado de São Paulo. Piracicaba, 1993. 103p. (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- CURY, R. Distribuição da diversidade genética e correlações de caracteres em etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) provenientes da agricultura tradicional do Brasil. Piracicaba, 1998. 163p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DARLINGTON, C.D.; WYLIE, A.P. **Chromosome Atlas os Flowring Plants**. Geoge Allen and University, London. 1955.
- DATTA, A.N.; MAITI, S.N.; BASAK, S.L. Outcrossing and isolation requirement in jute (*Corchorus olitorius* L.). **Euphytica**, v.31, p.97-101, 1982.
- DEMAURO, M.M. Relationship of breeding system to rarity in the Lakeside daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). **Conservation Biology**, v.7, p.542-550, 1993.
- DOMÍNGUEZ, C.E.; CEBALLOS, L.F.; FUENTES, C. Morfologia de la planta de yuca. In: DOMÍNGUEZ, C.E. **Yuca: investigation, production y utilization**. Cali: CIAT, 1984. p.29-49.
- DOW, B.D.; ASHLEY, M. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Journal of Heredity**, v.89, n.1, p.62-70, 1998.
- DUDASH, M.R.; RITLAND, K. Multiple paternity and self-fertilization in relation to floral age in *Mimulus gutatus* (Scrophulariaceae). **American Journal of Botany**, v.78, p.1746-1753, 1991.

ELLSTRAND, N.C.; TORRES, A.M.; LEVIN, D.A. Density and the rate of apparent outcrossing in *Helianthus* (Asteraceae). **Systematics Botany**, v.3, p.403-407, 1978.

EPPERSON; B.K.; CLEGG, M.T. First-pollination primacy and pollen selection in the moring glory, *Ipomoea purpurea*. **Heredity**, v.58, p.5-14, 1987.

FAEGRI, K.; PIJL, L. **The Principles of Pollination Ecology**. 3.ed. London: Pergamon International Library, 1980. 224p.

FAO. **Production yearbook**. Roma, 1991. p.94-95.

FARALDO, M.I.F. Caracterização isoenzimática e diversidade de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Piracicaba, 1994. 91p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

FARALDO, M.I.F. Distribuição da variabilidade genética e caracterização isoenzimática de etnovariedades em roças de mandioca (*Manihot 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-CENARGEN, 1995. 220p.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. **The Conservation of Plant Biodiversity**. Cambridge: University Press, 1995.

- FRIEDEN, C. Glutamate dehydrogenase. V. The relation of enzyme structure to the catalytic function. **Journal of Biological Chemistry**, v.238, p.3286-3299, 1963.
- FUKUDA, W.M.G.F.; CERQUEIRA, L.L. Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.5, n.2, p.13-21, dez. 1986.
- FUKUDA, W.M.G.; COSTA; I.R.S.; VILARINHOS, A.D.; et al. **Banco de Germoplasma de Mandioca: Manejo, Conservação e Caracterização**. Cruz das Almas: EMBRAPA- CNPMF, 1996. (Documento, 68)
- GRANER, E.A. **Contribuição para o estudo citológico da mandioca**. Piracicaba, ESALQ/Departamento de Genética, 1935. 28p.
- GRANER, E.A. Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca. **Bragantia**, v.2, n.1, p.1-14, 1942.
- GREENWOOD, M.S. Gene exchange in loblolly pine: the relation between pollination mechanism, female receptivity and pollen availability. **American Journal of Botany**, v.73, p.1443-1451, 1986.
- HAMES, D.B. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, D.B.; RICKWOOD, D. (Eds.) **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2 ed. Oxford University Press, New York, 1996. cap.1, p.1-139.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A. The breeding structure of tropical tree populations. **Pl. Sp. Biology**, v.5, p.157-165, 1990.

- HARDING, J.; MANKINEN, C.B.; ELLIOTT, M.H. Genetics of *Lupinus*. VII. Outcrossing, autofertility and variability in natural populations of the nanus group. **Taxon**, v.23, p.729-738, 1974.
- HERNANDEZ-JUVIEL, J.M.; MORAFKA, I.; DELGADO, G.; et al. Effect of enzyme dilution on the relative mobility of glutamate dehydrogenase isozymes in the prairie rattlesnake, *Crotalus viridis viridis*. **Copeia**, v.1992, p.1117-1119, 1993.
- HERSHEY, C.; AMAYA, A. Genética, citogenética, estrutura floral y tecnica de hibridacion de la yuca. In: DOMÍNGUEZ, C.E. **Yuca**: investigation, production y utilization. Cali: CIAT, 1984. p.113-125.
- HUSSAIN, A.; BUSHUK, W.; RAMIREZ, H.; et al. Identification of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars by electrophoretic patterns of esterase isozymes. **Seed Science & Technology**, v.15, p.19-22, 1987.
- JOS, J.S.; NAIR, R.B.; SREEKUMARI, M.T. Stigma receptivity and seed set in cassava. **Tropical Agriculture**, v.67, n.3, p.257-261, Jul. 1990.
- KARRON, J.D.; THUMSER, N.N.; TUCKER, R.; et al. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus rigens*. **Heredity**, v.75, p.175-180, 1995.
- KAWANO, K.; AMAYA, A.; RIOS, M.; et al. Factors affecting efficiency of hybridization and selection in cassava. **Crop Science**, v.18, p.373-376, 1978.
- KEARNS, C.A. **Techniques for Pollination Biologists**. Niwot: University Press, 1993. cap.6, p.197-214: Mating Systems.

- KEPHART, S.R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, v.77, n.5, p.693-712, 1990.
- KINK, W. Characters for breeding synthetic varieties in *Faba beans* (*Vicia faba* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.79, n.5, p.713-717, 1990.
- LEFÈVRE, F.; CHARRIER, A. Heredity of seventeen isozyme loci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v.66, n.1/2, p.171-178, 1993.
- LEHMANN, C.O. Collecting European land-races and development of European gene banks—historical remarks. **Die Kulturpflanze**, v.29, p.29-40, 1981.
- LEVIN, D.A.; KERSTER, H.W. The dependence of bee-mediated pollen and gene dispersal upon plant diversity. **Evolution**, v.23, p.560-571, 1969.
- LINHART, Y.B.; BUSBY, W.H.; BEACH, J.H.; et al. Forager behavior, pollen dispersal and inbreeding in two species of hummingbird-pollinated plants diversity. **Evolution**, v.41, p.679-682, 1987.
- LLOYD, D.G.; WEBB, C.J. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. Dichogamy. **New Zeland Journal Botanic**, v.24, p.135-162, 1986.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. **Revista de Biología Tropical**, v.35(Supl. 1), p.165-175, 1987.

- LOVELESS, M.D.; HANRICK, J.L.; FOSTER, R.B. Population structure and system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. **Heredity**, v.81, n.2, p.134-143, 1998.
- LYONS, E.E.; ANTONOVICS, J. Breeding system evolution in *Leavenworthia*: breeding system variation and reproductive success in natural populations of *Leavenworthia crassa* (Cruciferae). **American Journal of Botany**, v.78, n.2, p. 270-287, 1991.
- MAGOON, M.L.; KRISHNAN, R.; VIJAYA BAI, K. Morphology of the pachytene chromosome and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytology**, v. 34, p.612-624, 1969.
- MAITI, S.N.; DATTA, A.N.; BASAK, S.L. Outcrossing and isolation requirement in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). **Euphytica**, v.30, p.739-745, 1981.
- MANSHOLT, U.J. **Van Pesch Plantenteel, beknopte handleiding tot de kennis van den Nederlandschen landbouw**. 3.ed. Plantenteelt: Zwolle, 1909. 228p.
- MARSHALL, D.L.; ELLSTRAND, N.C. Proximal causes of multiple paternity in wild radish, *Raphanus sativus*. **American Naturalist**, v.132, p.596-605, 1985.
- MARTINS, P.S. Evolução e biologia de populações de plantas. In: ANAIS DO ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 13., Piracicaba, 1996. **Anais**. Piracicaba: Departamento de Genética, 1996. p.147-165.

- MAY, B. Starch gel electrophoresis of isozymes. In: HOELZEL, A.R. (Ed.) **Molecular Genetics Analysis of Populations: A Practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1992. cap.1, p.1-28.
- MAYR, E. Die Bedeutung der alpinen Getreidelandsorten für die Pflanzenzüchtung and Stammesforschung mit besonderer Beschreibung der Landsorten in Norditrol und Vorarlberg. *Zeitsch f Züchtung A: Pflanzenzüchtung*, v.19, p.195-228, 1934.
- MAYR, E. Alpine Landsorten in ihrer Bedeutung für die praktische Züchtung. *Forschungsdienst*, v.4, p.162-166, 1937.
- MITTON, J. The dynamic mating systems of conifers. **New Forests**, v.6, p.197-216, 1992.
- MONTEIRO, D.A.; LORENZI, J.O.; VALLE, T.L; et al. Produção de sementes de mandioca em plantas com um e dois ciclos vegetativos. **Bragantia**, v.43, n.2, p.667-672, 1984.
- MORESCO, E.R. Taxa de cruzamento natural do algodoeiro herbáceo no Estado de Mato Grosso. Piracicaba, 1999. 71p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MORGAN, M.T.; BARRETT, S.C.H. Outcrossing rates and correlated mating within a population of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). **Heredity**, v.64, p.271-280, 1990.
- MOSQUIN, T. Competition for pollinators as a stimulus for the evolution of flowering time. *Oikos*, v.22, p.398-402, 1971.

- MUOMA, O.; MORAN, G.; BELL, J.C. Hierarchical pattern of correlated mating in *Acacia melanoxylon*. **Genetics**, v.127, p.619-626, 1991.
- MURAWSKI, D.A.; DAYANANDAN, B.; BAWA, K.S. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lanka tropical rain forest. **Biotropica**, v.26, n.1, p.23-29, 1994.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v.67, p.167-174, 1991.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. The mating system of *Cavanillesia platanifolia* under extremes of flowering-tree density: a test of predictions. **Biotropica**, v.24, p.99-101, 1992.
- MURPHY, R.W.; SITES, J.W.; BUTH, D.G.; et al. Proteins: Isozyme Electrophoresis. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Eds.) **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer, 1996. cap.4, p.51-120.
- NASSAR, N.M.A. Conservation of genetic resources of cassava (mandioca), *Manihot esculenta* Crantz: determination of wild species localities with emphasis on cassava probable origin. **Ciência e Cultura**, v.28, n.12, p.1486-1492, 1976.
- OGBURIA, M.N.; ADACHI, T. Embryonic sac morpho-structural analysis of developmental pathways of fertilization failure, seed abortion and poor germination in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Cytologia**, v.60, p.75-84, 1995.

- 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.
- O'MALLEY, D.M.; BUCKLEY, D.P.; PRANCE, G.T.; et al. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb Bonpl: Lecythidaceae). 2. Mating system. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.929-932, 1988.
- ORREGO, J.I.; HERSHEY, C.H. Almacenamiento del polen de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por medio de liofilizacion y varios regimenes de humedad y temperatura. **Acta Agronomica**, v.34, n.1, p.21-24, 1984.
- PEREIRA, A.S.; LORENZI, J.O.; NORMANHA, E.S.; et al. Taxa de fecundação cruzada no cultivar de mandioca Branca-de-Santa-Catarina. **Bragantia**, v.37, p.XCV-XCVI, 1978.
- 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.
- PINHEIRO, J.C.D. Estudo de plantio de sementes sexuais de mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.4, n.1, p.73-78, 1985.

- RAJENDRAN, P.G. Estimation of gene systems governing yield and its component attributes in cassava. In: Central Tuber Crops Research Institute. **Annual Progress Report**, 1983. Trivandrum, India. pp.13-14. 1984.
- RAMIREZ, H.; HUSSAIN, A.; ROCA, W.; et al. Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. **Euphytica**, v.36, p.39-48, 1987.
- RENVOIZE, B.S. The area of origin of *Manihot esculenta* as a crop plant - a review of the evidence. **Economic Botany**, v.26, p.352-360, 1973.
- RIBEIRO, B. **Os índios das águas pretas: modo de produção e equipamento produtivo**. São Paulo: Companhia das Letras, Editora da Universidade de São Paulo, 1995. 270p.
- RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. 2 ed. Cambridge, Chapman & Hall, 1997. 529p.
- RITLAND, K. Joint maximum likelihood estimation of genetic and mating structure using open-pollinated progenies. **Biometrics**, v.42, p.25-43, 1986.
- RITLAND, K. The genetic-mating structure of subdivided populations II. Correlated mating models. **Theoretical Population Biology**, v.34, p.320-346, 1988.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v.43, p.848-859, 1989.

RITLAND, K. *MLTR* Multilocus mating system program Version 1.1. Distribuído pelo autor. (1996).

RITLAND, K; EL-KASSABY, Y.A. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, p.375-384, 1985.

RITLAND, K.; JAIN, A. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, v.47, n.1, p.35-52, 1981.

ROGERS, D.J. Studies of *Manihot esculenta* Crantz and related species. **Bulletin of Torrey Botanical Club**, v.90, n.1, p.43-54, 1963.

ROGERS, D.J.; APPAN, S.G. Flora neotropica: manihot, manihotoides (Euphorbiaceae). New York: Hafner Press, 1973, 272p. (Monografia 13).

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.

SAMPSON, J.F. Multiple paternity in *Eucalyptus rameliana* (Myrtaceae). **Heredity**, v.81, n.3, p.349-355, 1998.

SCHMIDT, C.B. A mandioca: contribuição para o conhecimento de sua origem. **Boletim de Agricultura**, v.52a, p.73-128, 1951.

SCHOEN; D.S.; CLEGG, M.T. Estimation of mating system parameters when outcrossing events are correlated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.81, p.5258-5262, 1984.

- SHAW, D.V.; ALARD, R.W. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, p.113-120, 1982.
- SINGH, A.P.; NAIR, R. C.; MAGOON, M.L. Palynological studies in (*Manihot esculenta* Crantz and *M. glaziovii* Muell. Arg. **Journal of the Indian Botanical Society**, v.47, n.3-4, p.358-367, 1968.
- SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; CHAIYASUT, K. Cytogenetic Investigation of some Euphorbiaceae in Thailand. **Cytologia**, v.64, p.229-234, 1999.
- SORENSE, F.G. Estimates of self-fertility in coastal Douglas-fir from inbreeding studies. **American Naturalist**, v.103, p.389-398, 1979.
- SUN, M.; RITLAND, K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. **Heredity**, v.80, n.2, p.225-232, 1998.
- SURLES, S.E.; ARNOLDI, J.; SCHNABEL, A.; et al. Genetic relatedness in open-pollinated families of two leguminous tree species *Robinia pseudoacacia* L. and *Gleditsia triconchos* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.49-56, 1990.
- UMANAH, E.E.; HARTMANN, R.W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.98, p.272-274. 1973.

- VALLE, T.L. Cruzamentos dialélicos em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Piracicaba, 1990. 171p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- WEBB, C.J.; BAWA, K.S. Pollen dispersal by hummingbirds and butterflies: comparative study of two lowland tropical plants. **Evolution**, v.37, p.1258-1270, 1983.
- WHESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice: a guide to theory and practice**. New York: VCH, 1993. cap.2, p.197-214: IEF in immobilized pH gradients.
- WORKMAN, P.J.; NISWANDER, J.D. Population studies on Southwestern Indian Tribes II. Local genetic differentiation in the Papago. **American Journal Human Genetic**, v.22, p.24-29, 1970.
- WORTHINGTON, C.B. **The evolution of IBP-International Biological Programme**. Cambridge, University Press, 1975. 268p.
- YATES, M.T.P.T.; MARSHALL, A.H.; WILLIAMS, I.H.; et al. The use of isoenzyme markers to determine pollen flow and seed paternity mediated by *Apis mellifera* and *Bombus* spp. in *Trifolium repens*, a self-incompatible plant species. **Journal of Apicultural Research**, v.36, n.2, p.57-62, 1997.
- YBERT, J.P. Observation du pollen de *Manihot* sp. (Euphorbiaceae) au microscope électronique à balayage. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v.122, p.131-133, 1975.

- YOUNG, A.G.; BROWN, A.H.D. Comparative analysis of the mating system of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides*. **Heredity**, v.80, n.3, p.374-381, 1998.
- ZEVEN, A.C. Four hundred years of cultivation of Dutch white clover landraces. **Euphytica**, v.54, p.93-99, 1991.
- ZEVEN, A.C. Results of activities to maintain landraces and other material in some European countries in situ before 1945 and what we learn from them. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.43, p.337-341, 1996.
- ZEVEN, A.C. The introduction of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) into Western Europe and phenotypic variation of dry beans collected in the Netherlands in 1946. **Euphytica**, v.94, p.319-328, 1997.
- ZEVEN, A.C. A review of definitions and classifications. **Euphytica**, v.104, n.2, p.127-139, 1998.

Apêndice 1

Solução Extratora n° 1 (Alfenas et al., 1991)

Fosfato de sódio bibásico	0,60 g
Sacarose	7,00 g
PVP-40	2,56 g
DTT	0,05 g
L-ácido ascórbico	0,10 g
Bissulfito de sódio	0,05 g
Borato de sódio (bórax)	0,05 g
Polietilenoglicol - 6000	1,00 g
Água destilada (q.s.p.)	100 ml

Apêndice 2

Soluções Estoque para a confecção de Géis em Poliacrilamida.

Solução A: Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)

Tris	6,0 g
TEMED	300 µl.
H ₂ O	40 ml

Procedimento: Dissolver o Tris em 40 ml de água e titular para pH 6,8 com 1 M HCl (~ 48 ml). Ajustar com água para volume final de 100 ml.

Solução B: Tris-HCl 3,0 M (pH 8,8)

Tris	36,3 g
HCl 1 M	48,0 ml
TEMED	300 µl.

Procedimento: Dissolver o Tris em 48 ml de HCl 1M e ajustar com água para volume final de 100 ml. A solução era titulada para pH 8,8 com HCl, quando necessário.

Solução C: Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8).

acrilamida	30 g
bisacrilamida	0,8 g

Procedimento: o soluto foi dissolvido em água destilada e completado para 100 ml.

Solução D: Persulfato de Amônia (0,2%)

Persulfato de amônia	100 mg
H ₂ O	2 ml

Solução E: Riboflavina (0,004%)

Riboflavina	4 mg
H ₂ O	100 ml

Tampão de corrida: Tris-glicina (pH 8,3)

Tris	1,5 g
Glicina	7,2 g

Procedimento: o Tris foi dissolvido em 1 litro de água. O tampão foi usado direto nas corridas.

Apêndice 3

Protocolos para Revelação Histoquímica de oito enzimas em gel de poliacrilamida em mandioca.

- Citosol Aminopeptidase (CAP) - E.C. 3.4.11.1

- L-Leucil- β -naftilamida-HCl	0,03 g
- Fast Black K salt	0,04 g
- Tampão Tris-maleato, pH 6,0	50 ml

Procedimento: o soluto foi dissolvido em 10 ml da solução de metanol a 10% e adicionou-se o tampão. A solução foi vertida sobre o gel, o qual foi incubado a 37°C no escuro até o aparecimento das bandas. O processo de revelação durou 10 a 15 minutos.

- Glucose 6-fosfoglucose isomerase (GPI) - E.C. 5.3.1.9

- Frutose-6-fosfato	0,04 g
- MgCl ₂ (1%)	2,0 ml
- NADP ⁺ (10mg/ml)	1,0 ml
- MTT (10mg/ml)	1,0 ml
- PMS (1mg/ml)	1,0 ml
- Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	10 unidades
- Tampão Tris-HCl (0,1M - pH 8,0)	50 ml

Procedimento: a frutose-6-fosfato foi dissolvida em 20 ml do tampão, adicionado o MgCl₂, NADP⁺, MTT, PMS e os 30 ml de tampão restante, em seguida foi colocada 10 unidades de glucose-6-fosfato desidrogenase. A solução

foi vertida sobre o gel, o qual foi incubado a 37°C no escuro até o aparecimento das bandas. O processo de revelação durou 20 a 30 minutos.

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

- Ácido Xiquímico	0,050g
- MTT(10mg/ml)	1,0ml
- NADP ⁺ (10mg/ml)	1,0ml
- PMS(1mg/ml)	1,0ml
- Tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,5	50 ml

Procedimento: o ácido xiquímico foi dissolvido em 20 ml do tampão, então adicionou-se o NADP⁺, MTT, PMS e os 30 ml de tampão restante. A solução foi vertida sobre o gel, o qual foi incubado a 37°C no escuro até o aparecimento das bandas. O processo de revelação durou 20 a 30 minutos.

- Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)-E.C.1.1.1.49

- Glucose-6-fosfato	0,10g
- MgCl ₂ (1%)	1,0ml
- NADP ⁺ (10mg/ml)	1,0ml
- MTT (10mg/ml)	1,0ml
- PMS (10mg/ml)	1,0ml
- Tampão Tris-HCl (0,2M - pH 8,0)	50ml

Procedimento: a glucose-6-fosfato foi dissolvida em 20 ml do tampão, então adicionou-se o MgCl₂, NADP⁺, MTT, PMS e os 30 ml de tampão restante. A

solução foi vertida sobre o gel, o qual foi incubado a 37°C no escuro até o aparecimento das bandas. O processo de revelação durou 20 a 30 minutos.

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

- Tampão Fosfato C	8 ml
- Tampão Fosfato D	42 ml
- Fast Blue BB salt	0,10 g
- Piridoxal - 5 – fosfato	0,01g
- Ácido L-aspártico	0,23 g
- Ácido α -cetoglutárico	0,04 g

Procedimento: o *Fast Blue BB Salt*, piridoxal, ácido L-aspártico e ácido α -cetoglutárico foram dissolvidos em 20 ml do tampão, combinação do tampão C e D, então adicionou-se os 30 ml de tampão restante. A solução foi vertida sobre o gel, o qual foi incubado a 37°C no escuro até o aparecimento das bandas. O processo de revelação durou 15 a 20 minutos.

- Glutamato desidrogenase (GTDH) - E.C. 1.4.1.3

- Ácido L-glutâmico	0,5 g
- NBT (10mg/ml)	1,0 ml
- NAD (10mg/ml)	1,5 ml
- PMS (1mg/ml)	0,5 ml
- Tampão Tris-HCl (0,1M - pH 8,0)	50 ml

Procedimento: o ácido glutâmico foi dissolvido em 20 ml do tampão, então adicionou-se o NAD, NBT, PMS e os 30 ml de tampão restante. A solução foi

vertida sobre o gel, o qual foi incubado à 37°C no escuro até o aparecimento das bandas. O processo de revelação durou de 45 minutos a 1 hora.

- Fosfatase ácida (ACP) - E.C. 3.1.3.2.

- α -naftil fosfato ácido de sódio	0,05 g
- <i>Fast itr red</i>	0,1g
- MgCl ₂ (1%)	1,0 ml
- Tampão Acetato de sódio (0,6M - pH 4,8)	50 ml

Procedimento: o α -naftil fosfato ácido de sódio e *Fast itr red* foram dissolvidos em 20 ml de tampão, então adicionou-se o MgCl₂ e os 30 ml de tampão restante. A solução foi vertida sobre o gel, o qual foi incubado à 37°C no escuro até o aparecimento das bandas. O processo de revelação durou de 1 a 2 horas.

- Isocitrato desidrogenase (IDH) - E.C. 1.1.1.42 (Alfenas et al., 1991)

- DL-Ácido isocítrico	0,10g
- MgCl ₂ (1%)	2,0ml
- NADP ⁺ (10mg/ml)	1,0ml
- MTT (10mg/ml)	1,0ml
- PMS (1mg/ml)	1,0ml
- Tampão Tris-HCl (0,1M - pH 8,0)	50ml

Procedimento: o ácido isocítrico foi dissolvido em 20 ml de tampão, então adicionou-se o MgCl₂, NADP⁺, MTT, PMS e os 30 ml de tampão restante. A

solução foi vertida sobre o gel, o qual foi incubado à 37°C no escuro até o aparecimento das bandas. O processo de revelação durou de 45 minutos a 1 hora.

- Catalase (CAT) - E.C. 1.11.1.6

- FeCl ₃ – Cloreto Férrico	1 g
- Ferrocianeto de Potássio	1 g
- Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)- 30%	20 µl

Procedimento: o Cloreto Férrico e Ferrocianeto de Potássio foram dissolvidos em 100 ml de água. O gel foi lavado 3 períodos de 15 minutos em água destilada, então foi incubado por 10 minutos em solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,003% (20 µl de H₂O₂ a 30% em 200 ml de água destilada). O gel foi novamente lavado em água destilada e incubado por 10 minutos na solução de Cloreto Férrico e Ferrocianeto de potássio a 1%. O aparecimento das bandas foi imediato.

Apêndice 4

Os alelos de sete sistemas isoenzimáticos foram transformados em 20 locos de dados binários para a realização da análise de agrupamento. O alelo 2 do sistema Aspartato aminotransferase (AAT) foi eliminado pois era monomórfico.

DG	<i>Cap-1</i>	<i>Cap-2</i>	<i>Skdh-1</i>	<i>Skdh-2</i>	<i>Skdh-3</i>	<i>Skdh-4</i>	<i>Gpi-1</i>	<i>Gpi-2</i>	<i>G6pdh-1</i>	<i>G6pdh-2</i>
112	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
17	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
197	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
69	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
73	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
67	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
44	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
43	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
42	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
45	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
65	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
23	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
70	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
138	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
111	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
113	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0
134	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
125	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
118	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
137	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
68	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
39	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
38	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
41	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0
58	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
60	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
54	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
139	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
116	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
115	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
132	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
133	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
129	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
131	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
117	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
119	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
46	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
55	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
59	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0
61	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
56	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0

62	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
51	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
48	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
124	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
123	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
126	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
127	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
130	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
128	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
120	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
121	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
47	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
49	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
50	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
52	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0

DG	<i>G6pdh-3</i>	<i>G6pd-4</i>	<i>Aat-1</i>	<i>Aat-3</i>	<i>Aat-4</i>	<i>Gtdh-1</i>	<i>Gtdh-2</i>	<i>Gtdh-3</i>	<i>Acp-1</i>	<i>Acp-2</i>
112	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
17	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
197	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1
69	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
73	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
67	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
44	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
43	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
42	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
45	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
65	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
23	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
70	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
138	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
111	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
113	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
134	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
125	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
118	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
137	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
68	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
39	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
38	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
41	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
58	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
60	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
54	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
139	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
116	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
115	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
132	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1
133	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1

129	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
131	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1
117	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
119	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
46	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
55	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1
59	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
61	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
56	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
62	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
51	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
48	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
124	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
123	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
126	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
127	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
130	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
128	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1
120	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
121	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
47	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1
49	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
50	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
52	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1