**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Diversidade genética de cará-do-ar (*Dioscorea bulbifera* L.)
originários de roças de agricultura tradicional por meio de
marcadores microssatélites**

Danielle Muniz da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra Ciências. Área de concentração: Ecologia
Aplicada

**Piracicaba
2013**

Danielle Muniz da Silva
Bióloga

Diversidade genética de cará-do-ar (*Dioscorea bulbifera* L.) originários de roças de agricultura tradicional por meio de marcadores microssatélites

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Ecologia Aplicada

Piracicaba
2013

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

Silva, Danielle Muniz da

Diversidade genética de cará-do-ar (*Dioscorea bulbifera* L.) originários de roças de agricultura tradicional por meio de marcadores microssatélites / Danielle Muniz da Silva. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2013.

93 p. : il.

Dissertação (Mestrado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2013.

1. Agricultura tradicional 2. Cará 3. Diversidade genética 4. Germoplasma vegetal
5. Marcadores moleculares I. Título

CDD 635.23
S586d

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

Aos meus pais, Edi e Augusto, por terem me ensinado o que mais importa na vida:
honestidade e a lutar pelos nossos sonhos,

Dedico

Aos meus irmãos e sobrinhos,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido ao Projeto: “Diversidade genética em acessos de inhame (*Dioscorea* spp.) originários de roças de agricultura tradicional e variedades comerciais avaliados por marcadores microssatélites”, processo de número 07/04805-2. E também pelo o apoio financeiro a mim concedido, por meio de bolsa de estudos (Processo: 10/04655-3).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida nos primeiros meses de mestrado.

À Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey, pela orientação e por tantos anos de convívio, generosidade e paciência. Foram muitos momentos de alegrias e muitas dúvidas, e por ter estado ao meu lado ao longo desses anos, sou muito grata!

À Profa. Dra. Anete Pereira Souza, do CBMEG/Unicamp e todos os seus alunos-monitores do curso de microssatélites de 2010, e principalmente à aluna de Doutorado, Camila Campos Mantello, por esses dois anos de erros e acertos com esses tão trabalhosos iniciadores – sem o seu incentivo e sua exaustiva ajuda, este trabalho não teria se materializado!

Agradeço também a todos os professores que cursei disciplina na ESALQ/USP, por tanta inspiração que me causaram, e vontade de sempre de fazer pesquisa além dos muros da universidade e enxergar que esse caminho só é de fato válido quando o que a gente faz se volta para o bem e desenvolvimento da sociedade.

À minha amada família, por acreditarem e sonharem comigo. Se estou aqui escrevendo estas palavras é porque durante todo esse tempo vocês me encorajaram. Aos meus sobrinhos – Vinícius, Millene, Lara e Maria Inês – minha alegria e ao mesmo tempo o meu pesar de não poder estar diariamente acompanhando o crescimento de vocês, que a cada dia que passa se tornam pessoinhas mais lindas e incríveis. Aos meus irmãos – Mônica, Adriana, Alexandre e Leninha – vocês são o que há de mais lindo nesse mundo, e eu sou um pouco de cada um de vocês. Aos cunhados, que além de parentes, também são muitos amados (e malas!) – Guto, Léa e Fábio. E aos meus pais, Edi e Augusto não existem palavras de agradecimento suficientes: obrigada por serem meu exemplo, minha sustentação – amo vocês mais que tudo! Meu pai, obrigada por diariamente me ensinar a viver com sabedoria e a pensar em todas as

consequências de uma atitude, me ensinar a viver um dia de cada vez, sempre agradecendo mais do que pedindo, e tendo fé. Minha mãe, obrigada por ser essa leoa sempre disposta a proteger seus filhotes, e me ensinar a lutar pelo que acredito e nunca abaixar a cabeça diante de uma adversidade. Obrigada por me educarem, por me ensinarem a aceitar e respeitar o diferente, e tratar a todos com igualdade.

Ao meu querido namorado, Lucas, por ser meu príncipe incentivador e por compartilhar comigo tantos planos. Que a nossa jornada seja cada dia mais bonita, sólida, divertida e cheia de companheirismo. E obrigada por ter a generosidade de me emprestar sua família toda, já que estou tão longe da minha... Sogrona (Vera), Sogrão (Paulo) e Cunhados (Leise, Liege e Marcelo), obrigada – vocês são meu porto-seguro piracicabano! E finalmente ao meu filho-felino, Yaki Muniz Emerique, que ao longo desses anos me deu todo o carinho e amor que alguém precisa e me fez entender um pouco sobre a maternidade... ainda que felina! E nos últimos dias dessa caminhada, um novo filho-felino veio para trazer alegria: Yoshi!

Às melhores amigas (e amigo) que alguém pode ter: Vanessa, Ana Flávia e Buda, amo vocês. Obrigada por deixarem minha vida mais leve e sempre divertida ao lado de vocês.

E à minha querida amiga Nancy, que se tornou uma irmã de sangue peruano, que sempre, sempre me animou, acreditando mais nos meus géis que eu! Obrigada por tantos finais de semana que roubei do seu descanso, por todas às vezes que reclamei nos teus ombros e tantos pedidos da Aji de Galina, a melhor comida do universo! Obrigada por ser minha amiga, irmã e companheira de trabalho. Não interessa para onde a vida vai nos levar, mas para sempre te levarei comigo.

Aos colegas de LEEGA, por tantos conhecimentos compartilhados. Em especial à Patricia Favoretto, Caroline Groppo, Marcos Siqueira, Thiago Mezette, Lidinalva Resende, Wellington Ferreira, Berenice Alcântara e Gustavo Recchia – sinto falta de vocês e das nossas risadas todos os dias – sem vocês a jornada teria sido muito mais dura.

Ao nosso técnico de laboratório, Marcos Cella, pela ajuda na casa de vegetação debaixo de um calorão e por me ajudar na maceração de todo material!

Às minhas plantinhas de *Dioscorea bulbifera*, que foram as estrelas desse trabalho! Depois que começamos a “conversar” e elas ganharam nomes, ficaram muito mais dóceis em fornecer DNA de qualidade!!!

À Mara Casarin, secretária do Programa PPGI-EA, sempre prestativa em todos os momentos e dúvidas do meu mestrado!

Aos mestres da Música Popular Brasileira, por me embalarem por suas músicas geniais: Chico, Bethânia, Paulinho da Viola, Tom, Elis, Vinícius e tantos outros... e aos

grandes mestres da literatura que também me acompanharam e me inspiraram: Caio Fernando Abreu, Leminski, Adélia Prado, Clarice Lispector, Hilda Hilst, Ana C., Cecília Meirelles...

E como já disse a colega Lidinalva em seus agradecimentos: agradeço ao povo brasileiro, que por meio de seus impostos financiaram este estudo – espero, sinceramente, poder retribuir à altura algum dia. Ao Governo Federal, pelos avanços sociais e por me fazer querer ser pesquisadora para contribuir com uma nova realidade deste país. Uma realidade que caminha para a verdadeira inclusão das minorias, onde negros, índios e pobres tem igualdade de oportunidades.

“Desistir não é nobre. E arduamente, não desistimos.”

Caio Fernando Abreu

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Classificação botânica e sistema reprodutivo do gênero <i>Dioscorea</i>	23
2.1.1 Classificação botânica e sistema reprodutivo de <i>Dioscorea bulbifera</i> L.	26
2.2 Domesticação e origem de <i>Dioscorea spp.</i>	28
2.3 Importância econômica do gênero <i>Dioscorea spp.</i>	31
2.4 Importância medicinal e atividades biológicas do gênero <i>Dioscorea</i>	32
2.5 Marcadores moleculares: microssatélites	34
2.6 Caracterização genética de <i>Dioscorea spp.</i> por meio de marcadores moleculares ...	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Material vegetal	41
3.2 Extração e Quantificação de DNA	42
3.3 Caracterização com marcadores microssatélites heterólogos.....	44
3.3.1 Amplificação dos locos microssatélites - heterólogos.....	44
3.3.2 Eletroforese do produto amplificado	46
3.4 Desenvolvimento de marcadores microssatélites	47
3.4.1 Construção de biblioteca genômica enriquecida	47
3.4.2 Análise das sequências e desenho dos iniciadores	50
3.4.3 Amplificação dos locos microssatélites	50
3.5 Análise genético-estatística	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Extração de DNA.....	53
4.2 Desenvolvimento de marcadores microssatélites	53
4.3 Caracterização e genotipagem dos microssatélites.....	56
4.4 Análises de diversidade genética	58
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	84

RESUMO

Diversidade genética de cará-do-ar (*Dioscorea bulbifera* L.) originários de roças de agricultura tradicional por meio de marcadores microssatélites

O gênero *Dioscorea* possui o maior número de representantes da família Dioscoreaceae e possui uma ampla variedade de espécies de importância econômica, por seu aspecto comestível e medicinal. Este estudo tem por objetivo caracterizar, por marcadores microssatélites, a diversidade genética de 42 acessos de *Dioscorea bulbifera* pertencentes ao banco de germoplasma *ex situ* da ESALQ/USP, originários de roças de agricultura tradicional dos Estados São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso e Goiás. Para esta caracterização foi desenvolvida uma biblioteca genômica enriquecida para *D. bulbifera*, visto que não havia iniciadores específicos para esta espécie. Foram também utilizados iniciadores heterólogos, desenvolvidos para outras espécies de *Dioscorea* por meio de transferibilidade. Esta biblioteca resultou em sete iniciadores, sendo seis deles polimórficos. Já a amplificação heteróloga resultou em amplificação positiva para 10 iniciadores testados, todos polimórficos. A análise genética foi realizada, portanto, com um total de 17 iniciadores. Os dados foram analisados como dados binários (presença e ausência de bandas), por tratar-se de uma espécie poliplóide. Foi observado um total de 63 alelos (bandas), com média de 3,7 alelos por loco. O índice de Shannon variou entre 0,18 e 0,68, o poder de discriminação (D) entre 0,70 e 0,97 e a heterozigosidade esperada entre 0,08 a 0,49. Ambas as análises de coordenadas principais e de agrupamento, esta última utilizando o índice de Jaccard, não indicaram a separação dos acessos de acordo com seu local de origem. Apesar de não se mostrar estruturada no espaço os dados apresentados neste estudo demonstram que existe grande variabilidade genética em *D. bulbifera* mantida por agricultores tradicionais de diversas regiões do Brasil, o que provavelmente se deve ao intercâmbio de materiais entre agricultores.

Palavras-chave: *Dioscorea*; Agricultura tradicional; Microssatélites; Diversidade genética; Germoplasma

ABSTRACT

Genetic diversity of cará-do-ar (*Dioscorea bulbifera* L.) originated from traditional agriculture using microsatellite markers

Dioscorea is the largest genus of Dioscoreaceae family and has a wide variety of species of economic interest, for their edible and medicinal properties. This study aimed to characterize, by microsatellite markers, the genetic diversity of 42 local varieties obtained from the *ex situ* germplasm collection belonging to ESALQ/USP, originating from São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso and Goiás. For this characterization we developed an enriched genomic library for *D. bulbifera*, since there were no primers specific for this species. We also tested 17 heterologous primers, developed for other *Dioscorea* species for cross-amplification. This enriched genomic library resulted in seven primers, six of them polymorphic. The cross-amplification resulted in 10 positive amplifications, all polymorphic primers. Therefore, the genetic analysis was conducted with a total of 17 primers. Data was analyzed as binary data (presence and absence of bands), being a polyploid species. A total of 63 alleles (bands) were found, with an average of 3.7 alleles per locus. The Shannon index ranged between 0.18 and 0.68, the discrimination power (*D*) between 0.70 and 0.97, and the expected heterozygosity from 0.08 to 0.49. Both principal coordinate and cluster analysis, using the Jaccard index, indicated no separation among the accessions according to their origin. Although no spatial structure was observed among the accessions, this study demonstrated high genetic diversity in *D. bulbifera* maintained by traditional farmers in Brazil, which probably can be explained by the exchanging of materials among farmers.

Keywords: *Dioscorea*, Traditional agriculture; Microsatellites; Genetic diversity; Germplasm

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Dioscoreaceae – 1) Aspecto geral de ramo florífero; 2) Flor masculina; 3) Flor masculina cortada longitudinalmente; 4) Ovário; 5) Ovário em corte transversal; 6) Fruto aberto; 7) Cará-do-ar; 8) Ramo com flores masculinas; 9) Botão de flor masculina/vista frontal; 10) Ramo com frutos e flores femininas; 11) Flor feminina; 12) Semente; 13) Diagrama Floral. Fonte: Joly (2002)25
- Figura 2 - a,b) *Dioscorea bulbifera* L. (Opsophyton), caule, folhas, flores e cápsulas.Fonte: Lebot (2009)26
- Figura 3 - a, b) *Dioscorea bulbifera* L., seções transversais de bulbilhos de diferentes genótipos. Fonte: Lebot (2009)27
- Figura 4 - Planta, folha e tubérculos de *Dioscorea bulbifera* L28
- Figura 5 - Centros de origem e épocas de domesticação da maioria das espécies cultivadas de *Dioscorea*. Fonte: Harris (1972)29
- Figura 6 - Distribuição de *D. bulbifera*, a única espécie que possui dois continentes como centro de origem. Fonte: Burkill (1960).....30
- Figura 7 - Classificação de microssatélites segundo Goldstein & Scholotterer (1999). 1) Perfeito; 2) Imperfeito; 3) Interrompido; e 4) Composto.....36
- Figura 8 - Desenvolvimento, distribuição, função e aplicações dos microssatélites. Fonte: Kalia et al. (2011).....37
- Figura 9 - Mapa do Brasil com os pontos de coletas de *D. bulbifera* (Elaborado por Luiz Rodrigues).....41
- Figura 10 - Gel de agarose 1% para quantificação de DNA extraído de *D. bulbifera*, utilizando DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Material quantificado em junho de 2010.....44

- Figura 11 - Construção de biblioteca genômica enriquecida de microssatélites através de hibridização seletiva. Adaptado por Grando (2009), de Zane et al. (2002).49
- Figura 12 - Gráfico de dispersão para análise de coordenadas principais utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard para 42 acessos de *Dioscorea bulbifera*, avaliados com marcadores microssatélites.....63
- Figura 13 - Dendrograma utilizando o coeficiente de Jaccard para 42 acessos de *D. bulbifera* avaliados.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Acessos de <i>Dioscorea bulbifera</i> , na qual é apresentado o número de acesso, a identificação no Banco de Germoplasma da ESALQ/USP, o município e a comunidade da coleta e o nome popular.....	43
Tabela 2 - Relação dos iniciadores de microssatélites testados e tamanho e amplitude de tamanho esperadas das bandas em pares de base (pb).....	45
Tabela 3 - Relação dos iniciadores SSR específicos de <i>Dioscorea bulbifera</i> , tamanho (pb) e amplitude de tamanho de bandas (pb).....	51
Tabela 4 - Iniciadores sintetizados para <i>Dioscorea bulbifera</i> , incluindo o nome dos iniciadores, sua sequência, número de acesso no GenBank, temperatura de anelamento (Ta), tamanho do iniciador em pares de base, o motivo, e o tipo de microssatélite.....	54
Tabela 5 – Relação de iniciadores amplificados, sua sequência, temperatura de anelamento (Tm), motivo, número de alelos e amplitude alélica em pares de bases.....	56
Tabela 6 – Iniciadores utilizados para 42 acessos de <i>D. bulbifera</i> , incluindo a sequência do iniciador, número de bandas (N_B), número de bandas polimórficas (N_{BP}), porcentagem de polimorfismo (P), parâmetro D, índice de Shannon (S) e heterozigosidade esperada (H_e).....	60
Tabela 7 – Valores do Índice de Shannon para <i>D. bulbifera</i> para os acessos originários de São Paulo e Minas Gerais.....	61

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As raízes e tubérculos desempenharão um papel importante na alimentação de países em desenvolvimento nas próximas décadas. Em 2020, mais de dois bilhões de pessoas na Ásia, África e América Latina dependerão dessas culturas como fonte de alimento, forragem ou meios para renda. Para os pequenos agricultores, o valor das raízes e tubérculos reside na sua capacidade de produzir mais energia digerível por hectare/dia do que qualquer outro produto básico, e sua capacidade para continuar a produzir onde outras culturas falham. No período de 1995 a 1997, os agricultores nos países em desenvolvimento colheram 439 milhões de toneladas das principais culturas de raízes e tubérculos: mandioca, batata, batata doce e inhame, com um valor estimado anual superior a 41 bilhões de dólares, ou seja, quase um quarto do valor dos principais cereais (Centro Internacional de La Papa, 1999).

Antes da introdução de outras culturas alimentares fornecedoras de raízes, o inhame era a principal fonte de carboidratos para os povos da África Ocidental e Central (OZEROL; MASSEY, 1984; CARMO, 2002). Os tubérculos do gênero *Dioscorea* possuem um elevado potencial econômico (RIZZINI; MORS, 1995), com cerca de 25 espécies utilizadas na alimentação humana. Estes tubérculos apresentam vitaminas do complexo B, contendo ainda vitamina A e C (ácido ascórbico), elevados teores de potássio, sódio, magnésio, fósforo, cálcio, ferro, cobre e zinco (CAZÉ FILHO, 2002). São ricos em amido (AMMIRATO, 1984; PEDRALLI, 2004) sendo apreciados pela farinha (RIZZINI; MORS, 1995). Contêm, aproximadamente, 8 a 10 mg de ácido ascórbico, em cada 100g de tubérculo, e foram utilizados na prevenção do escorbuto por marinheiros em viagens através dos oceanos, o que facilitou a sua ampla distribuição pelos trópicos (AMMIRATO, 1984).

No Brasil são poucas as instituições envolvidas com pesquisas relacionadas à cultura do inhame (CARMO, 2002), mesmo sendo uma cultura de grande importância, principalmente com relação à agricultura familiar e à agricultura de subsistência, por apresentar alta qualidade nutritiva e importantes propriedades medicinais.

É sabido que a quantificação da diversidade genética, a compreensão da sua distribuição, ou seja, a avaliação da existência de estrutura populacional, juntamente com estudos de fluxo gênico, são reconhecidos como importantes ferramentas para estudos de melhoramento genético e para o desenvolvimento de estratégias de conservação e de manejo de espécies (VANDERGAST et al., 2007).

Dioscorea bulbifera L. pertence a seção Opsophyton e é uma planta trepadeira que sempre se enrola em sentido horário e possui folhas alternadas. Dentro do gênero *Dioscorea* se destaca em três itens: primeiro, produz bulbilhos comestíveis na base meristemática dos seus pecíolos; segundo, é a única espécie de *Dioscorea* que ocorre em forma selvagem tanto na África como na Ásia; e terceiro, *D. bulbifera* se caracteriza por um alto índice intraespecífico de polimorfismo morfológico, especialmente nos seus bulbilhos (RAMSER et al., 1996). A espécie *D. bulbifera* possui um enorme potencial terapêutico e é amplamente usada na medicina tradicional chinesa e indiana, no tratamento de uma enormidade de desordens gástricas, câncer e diabete (SOUGATE et al., 2012).

Não há relato de nenhum estudo sobre a diversidade genética de *D. bulbifera* por meio de marcadores microssatélites, e sendo esta uma espécie de profundo interesse farmacêutico, uma avaliação sobre esta diversidade se faz necessária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Classificação botânica e sistema reprodutivo do gênero *Dioscorea*

O gênero *Dioscorea* possui o maior número de representantes da família Dioscoreaceae e possui uma ampla variedade de espécies de importância econômica, por seu aspecto comestível e medicinal. É um gênero bastante disperso, sendo encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (MONTALDO, 1991). Segundo Coursey (1976), o gênero teve uma dispersão mundial ampla no final do período Cretáceo, tendo evoluído em direções diferentes no Novo e Velho Mundo, originando assim espécies distintas. Já a separação das espécies asiáticas e africanas teria ocorrido mais tarde, durante o Mioceno.

A família Dioscoreaceae foi reconhecida inicialmente por Brown, em 1819, como o nome Dioscoreae (BURKILL, 1960; CARVALHO et al., 2009). São plantas trepadeiras herbáceas, que formam túberas ou rizomas. Purselove (1972) relata que são conhecidos aproximadamente seis gêneros e 650 espécies. Dentro do gênero *Dioscorea* se distinguem dois tipos de espécies: as medicinais (aproximadamente 50 espécies) e as comestíveis, que formam dois grupos: as espécies domesticadas e as espécies silvestres. Das 40 a 50 espécies domesticadas apenas 10 são cultivadas (*D. alata*, *D. bulbifera*, *C. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. esculenta*, *D. opposita-japonica*, *D. nummularia*, *D. pentaphylla*, *D. transversa* e *D. trifida*) (MALAURIE et al., 1998; LEBOT, 2009).

Taxonomicamente, o gênero *Dioscorea* é subdividido em várias seções:

1. Enantiophyllum- *D. rotundata* Poir, *D. alata* L, *D. cayenensis* Lam, *D. opposita* Thunb, *D. japonica* Thunb, *D. nummularia* Lam., *D. transversa* R.Br.
2. Lasiophyton - *D. dumetorum* (Kunth) Pax, *D. hispida* Dennst., *D. pentaphylla* L.
3. Opsophyton- *D. bulbifera* L.
4. Combilium - *D. esculenta* (Lour) Burk.
5. Macrogynodium – *D. trifida* L.

Um aspecto morfológico importante é o fato das plantas da seção Enantiophyllum caracterizarem-se pelo fato das vinhas enrolarem-se no sentido horário. Todas as outras seções se caracterizam pelas vinhas enrolarem-se no sentido anti-horário. Esta característica é muito importante para a classificação das plantas, pois é um aspecto levado em consideração para a elaboração de chaves taxonômicas (WILSON, 1988).

As folhas apresentam grande variação morfológica (PEDRALLI, 2002), sendo geralmente alternas, opostas ou espiraladas, lobadas ou não, pecioladas em forma de coração ou seta; a inflorescência desenvolve-se na axila das folhas superiores, em geral como panícula ou espiga (JOLY, 1998). As flores são actinomorfas, trímeras, pequenas, geralmente unissexuais e algumas com odor. As flores masculinas possuem odor adocicado e grão de pólen viscoso fortemente aderido à antera; as femininas são maiores, com ovário ínfero, tricarpelar, trilocular, em geral com muitos óvulos e alguns nectários septais (WEBERLING; SCHWANTES, 1986; DAHLGREN, CLIFFORD, 1982; JOLY, 1998; PEDRALLI, 2002). Os frutos são do tipo cápsulas tri-aladas, bagas ou drupas (PEDRALLI, 2002). As sementes podem ser aladas, ou não (JOLY, 1998), reticuladas ou lisas, com tamanhos variados (PEDRALLI, 2002), possuindo embrião pequeno bem diferenciado e cotilédone lateral imerso no endosperma, o qual contém lipídeos e aleurona (PEDRALLI, 2004) (Figura 1).

Quanto ao sistema reprodutivo do inhame, predomina a alogamia. Todas as Dioscoreáceas são dióicas, nascendo ocasionalmente inflorescências masculinas e femininas na mesma planta. A propagação é feita pelos tubérculos, ou seja, por propagação vegetativa, ou por sementes (ABRAHAM; NAIR, 1990; MONTALDO, 1991; ZOUNDJIHEKPON et al., 1997).

Estudos citogenéticos em espécies de *Dioscorea* ainda são bastante discutidos. O número básico de cromossomos é considerado $x=10$ e $x=9$, com alta frequência de espécies poliplóides (ESSAD, 1984). Espécies tetraplóides são mais frequentes, seguidas dos tipos $2x$, $6x$ e $8x$ em proporções similares. O número básico $x=10$ de cromossomos é encontrado em 52% das espécies africanas e 13% das espécies americanas. O restante das espécies africanas e americanas possuem número básico $x=9$. No entanto, dados recentes apontam para dois novos básicos de cromossomos, $x=6$ (SEGARRA-MORAGUES, 2004) e $x=20$ para *D. rotundata* (SCARCELLI et al., 2005) e *D. trifida* (BOUSALEM et al., 2006). Caso esses números sejam confirmados em um grande número de espécies, o número básico de cromossomos do gênero poderá ser reconsiderado, levando ao decréscimo do nível de ploidia em algumas espécies (BOUSALEM et al., 2006).

Figura 1 - Dioscoreaceae – 1) Aspecto geral de ramo florífero; 2) Flor masculina; 3) Flor masculina cortada longitudinalmente; 4) Ovário; 5) Ovário em corte transversal; 6) Fruto aberto; 7) Cará-do-ar; 8) Ramo com flores masculinas; 9) Botão de flor masculina/vista frontal; 10) Ramo com frutos e flores femininas; 11) Flor feminina; 12) Semente; 13) Diagrama Floral. Fonte: Joly (2002)

Estima-se que ocorram no Brasil entre 150 e 200 espécies de *Dioscorea*, único gênero da família presente em todas as regiões do país, desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul (PEDRALLI, 2002, 2004). Os principais Estados produtores encontram-se na região Nordeste, onde são cultivados mais de 90% da produção brasileira, predominando o cultivo de espécies comestíveis. Espécies com finalidade farmacológica são cultivadas nas regiões Sul, Centro Sul, Sudeste, Oeste e Norte (COELHO, 2002).

2.1.1 Classificação botânica e sistema reprodutivo de *Dioscorea bulbifera* L.

Dioscorea bulbifera L. (Figuras 2, 3 e 4), segundo Correa (1978), são plantas trepadeiras, robustas, de caule herbáceo, cilíndrico, estriado enrolando-se no sentido anti-horário, com folhas alternas, longo-pecioladas com o limbo muito desenvolvido, perfeitamente cordiformes, com 12 a 18 cm de comprimento e 10 a 15 cm de largura. A inflorescência masculina é paniculada, com 12 cm ou mais, composta, e a inflorescência feminina está contida em longas espigas axilares com 18 a 25 cm de comprimento; as flores são sésseis, solitárias, pequenas, pouco aparentes com perigônio violáceo e seis estames férteis. O fruto é uma cápsula oblonga, sendo que em cada lóculo estão contidas duas sementes aladas na parte inferior. Esta espécie é uma das mais importantes da família, e distingue-se facilmente das outras espécies pelos numerosos bulbilhos ou túberos aéreos, os quais nascem na axila das folhas e são muito variáveis em forma e tamanho. A reprodução vegetativa é o seu principal mecanismo de propagação.

Figura 2 - a,b) *Dioscorea bulbifera* L. (Opsophyton), caule, folhas, flores e cápsulas. Fonte: Lebot (2009)

Figura 3 - a, b) *Dioscorea bulbifera* L., seções transversais de bulbilhos de diferentes genótipos. Fonte: Lebot (2009)

A espécie possui vários nomes populares, todos inspirados na forma de seu bulbo, entre eles, podemos citar: cará do ar, cará moela, cara fígado ou inhame fígado, cará paquera e cará preto (BRESSAN et al., 2005; VEASEY et al., 2010).

Seus túberos aéreos são nutritivos e saborosos, ricos em glúten denominado cará-glutina e chegam a medir 10 cm de comprimento e pesarem 100g, nos quais é encontrado um princípio ativo tóxico, que em alguns países acredita-se que vitime animais e parece desaparecer com uma simples lavagem. Um fato interessante é que este metabólito secundário parece não existir nos túberos produzidos no Brasil e nas Antilhas. Acredita-se que a planta seja originária da Índia e Australasia e tenha sido introduzida no Brasil pelos holandeses. Na medicina popular, os bulbilhos e as túberas são utilizados como diuréticos e como cataplasmas em furúnculos (CORREA, 1978).

Figura 4 - Planta, folha e tubérculos de *Dioscorea bulbifera* L

2.2 Domesticação e origem de *Dioscorea* spp.

As espécies de maior consumo alimentar se originaram em três centros isolados: África, sudeste da Ásia e América do Sul (ALEXANDER; COURSEY, 1969). Entre as espécies mais importantes para o consumo humano, se destacam espécies, como: *Dioscorea alata*, *D. rotundata-cayenensis*, *D. trifida* e *D. bulbifera* (VEASEY et al., 2010), sendo que estas espécies foram domesticadas em diversas áreas do planeta (Figura 5).

Dioscorea alata é originada do sudeste da Ásia e é possivelmente a espécie mais cultivada de inhame no mundo, e também uma das cultivadas há mais tempo (LEBOT, 2009). Foi introduzida na América por volta do século 16 por colonizadores portugueses e espanhóis (ONWUEME; CHARLES, 1994). O complexo *D. cayenensis*-*D. rotundata* apresenta espécies que são nativas do oeste da África (COURSEY, 1967).

D. trifida é a única espécie, entre as mais consumidas e cultivadas, que é originária da Américas, tendo como possível centro de origem o norte da América do Sul. Pesquisadores apontaram que esta espécie já era consumida na América do Sul há sete mil anos, juntamente com outras espécies como mandioca e taioba (PIPERNO et al., 2000; SIQUEIRA, 2011), porém não se sabe em que medida os ameríndios cultivavam este inhame ou foram simplesmente recolhendo-o do seu meio natural. É possível que os imigrantes europeus e africanos tenham começado a cultivar este inhame assim que chegaram às Américas (LEBOT, 2009).

Figura 5 - Centros de origem e épocas de domesticação da maioria das espécies cultivadas de *Dioscorea* - Fonte: Harris (1972)

D. bulbifera é a única espécie originada tanto na Ásia quanto na África (Figura 6), onde ainda são encontradas em estado selvagem e pode-se dizer que ela ainda está em domesticação na Melanésia. As variedades asiáticas possuem tubérculos menos angulares, menos esféricos e tóxicos que as variedades africanas (LEBOT, 2009).

Figura 6 - Distribuição de *D. bulbifera*, a única espécie do gênero *Dioscorea* que possui dois continentes como centro de origem - Fonte: Burkill (1960)

Quando o povo originário de Bornéu colonizou Madagascar, há aproximadamente 2000 anos, foi possível que tenham introduzido *D. alata*, juntamente com taro (*C. esculenta*) e banana (*Musa* sp.), pois estas espécies já existiam lá quando chegaram os colonizadores franceses. De lá, essa espécie poderia ter se espalhado para a África Oriental e, posteriormente, à África central, e daí para o cinturão de inhame da África Ocidental. O comércio de escravos e o estabelecimento de colônias espanholas no Caribe provavelmente contribuíram para a dispersão de inhames africanos (*D. cayenensis*/*D. rotundata*). Os tubérculos provavelmente foram carregados em navios para alimentar os escravos durante a viagem e o excedente replantado na chegada às Índias Ocidentais (LEBOT, 2009).

Quando o capitão James Cook chegou ao Havaí, por volta de 1778, ele observou que os polinésios, que colonizaram o Havaí, tinham introduzido *D. alata*, *D. bulbifera* e *D. pentaphylla* (HANDY, 1985), provavelmente a partir de Taiti. Os polinésios, incluindo os havaianos, levaram o inhame, juntamente com outras culturas de propagação vegetativa, em seus barcos e os distribuíram ao longo das ilhas do Pacífico durante os tempos pré-históricos. Botânicos que viajavam com os exploradores franceses, Bougainville e La Pérouse, informaram que viram pelo menos cinco espécies distintas de *Dioscorea* nas ilhas polinésias que visitaram (LEBOT, 2009). Atualmente espécies de *Dioscorea* estão espalhadas por mais de 50 países tropicais (LEBOT, 2009).

2.3 Importância econômica do gênero *Dioscorea* ssp

No ano de 2010, de acordo com a FAO, cultivaram-se 25.300 hectares de inhame, obtendo-se uma produção de 232.100 toneladas, apresentando uma produtividade de 9,1 toneladas por hectare (FAO, 2009). A maioria da produção mundial está localizada na África (em torno de 96%). De 1975 a 1990 a área total cultivada no mundo aumentou em torno de 38,8%, entretanto a importância do cará na economia das áreas produtoras parece estar declinando devido à competição com outras culturas, como por exemplo, a mandioca (OPARA, 1999). Mesquita (2002) relata que três países africanos produzem 85% da produção mundial de cará. São eles: Gana, Costa do Marfim e Nigéria. A Nigéria, sozinha, assume 70% do que se produz mundialmente, acima de 29 milhões t/ano, com uma produtividade média de 10.500 kg/ha. Entretanto, países como o Japão, que dispõe de maior nível tecnológico, chegam a alcançar uma produtividade superior a 18.000 kg/ha (FAO, 2010).

O tubérculo desempenha um importante papel cultural nas tradições da África Ocidental (COURSEY, 1967; ORKWOR, 1998) além de ser a cultura mais importante em termos de área e alimento básico, particularmente na Nigéria, Benin, Costa do Marfim e Togo (KALU; ERHABOR, 1990; OLASANTAN, 1999; BAIMEY et al., 2006; ILE et al., 2006). O inhame é importante para a vida sócio-cultural (DÉGRAS, 1994) na África Ocidental e nas Ilhas do Pacífico onde a domesticação de espécies selvagens ainda é praticada por meio de seleção realizada por agricultores (MIGNOUNA; DANSI, 2003; VERNIER et al., 2003; LEBOT, 2009), o que a torna importante, principalmente por ter um ciclo anual e disponibilizar alimentos através da multiplicidade de espécies e cultivares, ampla adaptação agroecológica, períodos de maturidade diversas, assim como opções de armazenamento e utilização, bem como alto rendimento e altos valores de mercado (ASIEDU; SARTIE, 2010).

No cenário Sul Americano, a Colômbia é a maior produtora, com 32 mil hectares e uma produção de 395 mil toneladas (FAO, 2010). Já o Brasil ocupa o segundo lugar como principal produtor da América do Sul, com uma área colhida de 25 mil hectares e produção de 232 mil toneladas (FAO, 2010). Embora seja considerada, na maioria dos casos, uma cultura de subsistência, o inhame tem grande importância socioeconômica no cenário da agricultura familiar no Nordeste do Brasil, com um significativo potencial de desenvolvimento, contribuindo para alimentação humana, beneficiando populações carentes, além de ser fonte de renda para pequenos e médios produtores (MENDES, 2005; SANTOS; MACEDO, 2006). Os principais estados produtores são a Paraíba, Pernambuco e Bahia, respondendo por 90% da produção nacional. O destino da produção varia de acordo com a qualidade do produto e da

época do ano, podendo abastecer vários estados do Nordeste e de outras regiões, ou ainda, seguir a rota da exportação. Da produção brasileira de inhame, 4.000t/ano são exportadas, enquanto que outros países sul-americanos destinam sua produção inteiramente ao mercado interno (FAO, 2005). Dessa forma, esta cultura se destaca pelo seu alto valor comercial, com forte potencial no agronegócio de exportação para Europa, especialmente França, Inglaterra e para os Estados Unidos (RITZINGER et al., 2003; SANTOS; MACEDO, 2006).

Na última década, o agronegócio internacional do inhame vem tendo um aumento expressivo, contribuindo para a expansão de áreas cultivadas no Nordeste. Porém, os reduzidos investimentos em ciência e tecnologia têm ameaçado a posição do Brasil no mercado Sul Americano (MESQUITA, 2001).

Apesar de cultivado em vários continentes, o inhame (*Dioscorea* spp.) ainda apresenta limitações na produtividade. No Nordeste do Brasil onde são cultivados mais de 90% da produção brasileira, os principais fatores responsáveis pela baixa produtividade são o manejo inadequado da cultura, o uso de túberas-semente de inferior qualidade (desuniformidade no tamanho e na maturação, ferimentos nas túberas que facilitam a contaminação por microrganismos do solo e o elevado custo das túberas-semente, que representa cerca de 60% do custo de produção desta cultura (CAZÉ FILHO, 2002).

O desenvolvimento de produtos alimentícios tendo como base raízes tropicais, de tradição de cultivo e apelo cultural como o inhame, tem obtido o interesse dos produtores rurais e industriais, pois possibilita o incremento de toda a cadeia produtiva (CRIVELARO, 2008).

2.4 Importância medicinal e atividades biológicas do gênero *Dioscorea*

Os tubérculos acumulam, em muitas espécies, compostos secundários em quantidades variáveis, que fazem parte da sua defesa química (COURSEY, 1967; JANZEM, 1980). Estes compostos secundários têm aplicações em indústrias farmacêuticas e podem ser alcalóides, taninos e saponinas. Os taninos ocorrem em poucas espécies e até 1977 algumas delas eram cultivadas na Tailândia para utilização no curtume de couro ou de redes de pescas. Os alcalóides também são de distribuição restrita e altamente venenosos, provocando paralisia no sistema nervoso central. As saponinas são os compostos secundários de maior ocorrência e mais importantes do ponto de vista econômico (COURSEY, 1967).

A saponina é um glicosídeo que consiste de um resíduo de açúcar ligada a um complexo de anéis com 27 a 31 átomos de carbono através de uma molécula de oxigênio. A hidrólise desse composto libera o açúcar e o álcool policíclico que é a sapogenina. Todas as sapogeninas importantes dos inhames são de natureza esteroideal, por apresentarem o mesmo tipo de estrutura do composto ciclopentanoperidofenantreno (VIANA, 1985). O interesse pelo estudo das saponinas esteroidais iniciou-se na década de 40, quando se descobriu a inter-relação estrutural entre essas substâncias e as secretadas pelas glândulas sexuais e suprarrenais, ou seja, hormônios sexuais e corticóides (COURSEY, 1967). Os hormônios corticóides são utilizados no tratamento de processos inflamatórios e os sexuais modificados formam a base para a síntese de anticoncepcionais (VIANA, 1985).

A procura por fontes alternativas de matéria-prima para a síntese de hormônios esteroidais (andrógenos, estrógenos e progesteronas) e corticosteróides, os quais podem ser utilizados como anti-inflamatórios, agentes anticancerígenos, no tratamento de distúrbios por deficiência hormonal, na forma de contraceptivos orais e anabolizantes, resultou no fim da década de 40, na utilização de sapogeninas esteroidais vegetais em substituição às substâncias de origem animal, tais como o colesterol e os ácidos biliares. Sendo assim, a extração de diosgenina, realizada a partir das espécies de *Dioscorea*, fez com que muitas dessas espécies se tornassem raras, dificultando e tornando caro para as indústrias utilizar fontes selvagens ainda não exploradas. Desta forma, as sapogeninas esteroidais adquiriram grande importância econômica, como precursores de esteróides farmacologicamente ativos, incluindo os anticoncepcionais de via oral, os corticosteróides e os hormônios sexuais (BRENAC; SAUVAIRE, 1996; OASHI, 1999).

O cultivo, em larga escala, das espécies de *Dioscorea* utilizadas para a produção de sapogeninas, não foi bem sucedido, pois a necessidade de tutoramento das plantas e a produção de tubérculos de grande tamanho encareciam o plantio e a coleta (VIANNA, 1985). Os corticóides derivados da diosgenina estão entre os 10 mais receitados de origem vegetal (NARULA, 2007). A produção mundial dessa cultura aumentou em torno de 40% entre 1961 a 1999 (FAO, 2005), o que provavelmente se deu devido à agroindústria farmacêutica que se tornou um campo do agronegócio do inhame, considerado bastante amplo que envolve a extração e uso dos derivados da diosgenina (PEDRALLI, 2002).

As plantas do gênero *Dioscorea* também são amplamente utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer. *D. collettii* var. *hypoglauca* é uma espécie utilizada, por vários séculos, como remédio na China, pois possui em seu rizoma 14 tipos de saponinas esteroidais (HU et al., 1997), sendo utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, tais como câncer

cervical, tumor renal e da bexiga (HU; YAO, 2002). Algumas espécies de *Dioscorea*, consideradas tóxicas, são utilizadas pelos indígenas Xavantes, Borore, Pacaas, Novos, Surui, Cinta Larga e Kajara, das regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil, em suas flechas na pesca e na caça (PEDRALLI, 2002).

Dioscorea bulbifera é usada no tratamento de úlceras, hemorróidas, disenteria e sífilis, e considerada uma espécie em potencial para substituir a espécie *D. deltoidea*, que é a principal fonte de diosgenina. Embora apenas alguns traços de diosgenina tenham sido detectados, a espécie *D. bulbifera* é amplamente usada pelos índios em sua medicina tradicional (NARULA, 2007).

2.5 Marcadores moleculares: microssatélites

Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso (como isoenzimas) ou de um segmento específico de DNA. O marcador molecular recebe o nome de marcador genético quando seu comportamento se baseia nas leis básicas da herança mendeliana (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Até meados da década de 1960, os estudos de genética e melhoramento de plantas se baseavam em marcadores morfológicos, determinados por mutações simples que geravam alterações fenotípicas de fácil identificação. Esses marcadores contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos em plantas. No entanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica, os efeitos deletérios das mutações e o fato de muitos marcadores só poderem ser identificados na fase adulta das plantas, limitaram sua utilização para a geração de mapas genéticos e para o melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; GUIMARÃES; MOREIRA, 1999).

Na década de 1980, foi descrita a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), que consiste na síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA através da extensão, por meio de DNA polimerase, de um par de oligonucleotídeos, utilizados como iniciadores (primers) (MULLIS; FALOONA, 1987). Sua facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade possibilitaram o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares (GARCIA, 2009).

Dos diversos marcadores desenvolvidos a partir da descrição do PCR, como AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), os marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) são os que mais se aproximam do marcador ideal para estudos de genética de populações (RAFALSKI et al., 1996), por serem altamente polimórficos, terem caráter co-dominante, multialelismo, distribuição aleatória no genoma e alta reprodutibilidade (SOSINSKI et al., 2000).

Os marcadores SSR foram encontrados no genoma de eucariotos na década de 1980 (TAUTZ, 1989), e são regiões genômicas (locos) formados por unidades ou blocos compostos de 1 a 6 nucleotídeos (chamados de motivos) repetidos em sequência e variando em tamanho entre indivíduos. Quando o motivo (ou unidade de repetição) é composto de um nucleotídeo, o marcador é chamado de mononucleotídeo. A repetição de motivos formados por dois nucleotídeos forma um microssatélite do tipo dinucleotídeos; a repetição de motivos formados por três, quatro, cinco e seis nucleotídeos formam microssatélites do tipo tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, respectivamente. Quanto à composição das sequências, os microssatélites podem ser classificados como (GOLDSTEIN; SCHLOTTERER, 1999):

- Perfeitos, quando possuem uma única repetição sem interferência de um nucleotídeo diferente em sua sequência, exemplo: CTCTCTCT;
- Imperfeitos, quando possuem um ou mais nucleotídeos que não correspondem à unidade de repetição, exemplo: GTGTGTAGTGTGT;
- Interrompido, quando há inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na repetição do motivo, exemplo: AGAGAGAGGGAGA;
- Ou compostos, quando são intercalados por dois ou mais motivos distintos, exemplo: GTGTGTCACACA.

Figura 7 - Classificação de microssatélites segundo Goldstein; Scholotterer (1999). 1) Perfeito; 2) Imperfeito; 3) Interrompido; e 4) Composto

As interrupções parecem estabilizar os microssatélites, diminuindo a possibilidade de erro durante a replicação (WEBER, 1990), fazendo com que os microssatélites perfeitos possuam, geralmente, mais alelos que microssatélites interrompidos (PEPIN et al., 1995).

Microssatélites podem ser detectados pelo uso da técnica PCR e visualizados por diferentes métodos cromatográficos (GUPTA et al., 1996). O conjunto de fragmentos (ou alelos) detectado para um loco é chamado de haplótipo. Um ou mais haplótipos produzem um perfil molecular, podendo ser interpretados como códigos de barra biológicos e podendo gerar perfis exclusivos para cada indivíduo.

A forma como se originam e a dinâmica de mutação dos microssatélites no genoma dos organismos ainda é incerta, porém, se sabe que a taxa de mutação dos microssatélites é muito alta se comparadas com outras partes do genoma, variando de 10^{-6} a 10^{-2} nucleotídeos por loco por geração (SIA et al., 2000; SCHOLOTTERER, 2000).

Estudos sugerem como principal mecanismo de surgimento e amplificação de microssatélites sejam dois eventos: a) o *slippage* ou deslizamento da polimerase. Acredita-se que durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e se unem novamente de forma incorreta, e isto geraria cópias de trechos de DNA com diferentes tamanhos ou números de repetições no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade repetitiva (BHARGAVA; FUENTES, 2010); b) Durante o processo

de *crossing-over* desigual pode ser responsável pela alta taxa de polimorfismo destes marcadores, que por problemas no pareamento dessas sequências durante o quiasma, aumenta a taxa de mutação das regiões microsatélites e são estas mutações que tornam estes marcadores tão informativos (SCHOLOTTERER et al., 1998; BHARGAVA; FUENTES, 2010).

A principal vantagem em utilizar essa tecnologia é a possibilidade de detectar o polimorfismo diretamente do DNA genômico, sem a influência da variação ambiental ou gênica. Devido a sua propriedade em revelar um alto grau de polimorfismo, os microsatélites tornaram-se ideais para: a) o mapeamento genético, principalmente para análise de ligação e de associação de genes a doenças; b) estudos populacionais; c) caracterização dos sistemas reprodutivos; e d) seleção assistida (TANKSLEY, 1993; VAN OOSTEROM; CECCARELLI, 1993; OLUFOWOTE et al., 1997; COLLEVATTI et al., 2001) (Figura 8) .

Figura 8 - Desenvolvimento, distribuição, função e aplicações dos microsatélites. Fonte: Kalia et al. (2011)

Análise da diversidade, medidas de similaridade genética ou diferenças entre espécies de plantas, são informações importantes na conservação das espécies (ROMERO et al., 2009). Além disso, essas informações são também úteis para a caracterização de acessos em coleções de plantas de germoplasma e estudos taxonômicos. Em anos recentes, os marcadores microssatélites provaram ser uma ferramenta poderosa para a estimativa da diversidade genética (variação na sequência de nucleotídeos, a estrutura do gene, cromossomos e genomas inteiros) e as relações filogenéticas das espécies com base na conservação de sequências devido à sua elevada eficiência, a natureza co-dominante, e elevado grau de polimorfismo.

2.6 Caracterização genética de *Dioscorea* spp. por meio de marcadores moleculares

Marcadores isoenzimáticos foram utilizados em *Dioscorea*, para estudos da diversidade genética de 269 cultivares de *D. alata* originários do sul do Pacífico, Ásia, África, Caribe e América do Sul (LEBOT et al., 1998), no estudo da diversidade genética de diversos acessos do complexo *D. cayenensis/D. rotundata*, originários de países da África (DANSI et al., 2000; MIGNOUNA et al., 2002), bem como no entendimento de padrões de segregação para locos isoenzimáticos em *D. rotundata* (SCARCELLI et al., 2005). No Brasil, os marcadores isoenzimáticos foram utilizados para o estudo da diversidade genética entre etnovarietades do Vale do Ribeira das espécies *D. trifida*, *D. cayenensis*, *D. alata* e *D. bulbifera* (BRESSAN, 2005; BRESSAN et al., 2011), constatando-se alta variabilidade genética mantida pelos agricultores desta região, sendo que tal variabilidade não se encontra estruturada no espaço.

Já os marcadores RAPD foram utilizados para avaliar a variabilidade intra-específica em acessos de *D. bulbifera* originários da África, Ásia e Polinésia (RAMSER et al., 1996), para avaliar cultivares das espécies *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. trifida* e *D. esculenta* (ASEMOTA et al., 1996), e no estudo do complexo *D. cayenensis/D. rotundata* (DANSI et al., 2000). Dixit et al. (2003) avaliaram a estabilidade genética de plantas regeneradas a partir de tecidos criopreservados embriogênicos de *Dioscorea bulbifera* L. usando RAPD. Este marcador foi também utilizado, juntamente com marcadores AFLP para a caracterização de germoplasma de *D. rotundata* (MIGNOUNA et al., 2003), e para a caracterização da variação entre espécies selvagens e cultivadas de *Dioscorea* (MIGNOUNA et al., 2005), tendo os autores concluído que os cultivares classificados como *D. cayenensis* deveriam ser considerados como um táxon separado de *D. rotundata*. O marcador AFLP também foi utilizado para avaliar a diversidade genética em *D. alata* e sua relação com outras

nove espécies comestíveis de *Dioscorea* (MALAPA et al., 2005) e também em estudos sobre a domesticação do gênero *Dioscorea* (SCARCELLI et al., 2006). Também com AFLP, Tamiru et al. (2007) avaliaram 48 acessos de inhame da Etiópia e a sua relação com os inhames de espécies normalmente cultivadas no oeste da África, tais como *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, e *D. rotundata*.

Em relação à utilização de marcadores microssatélites para as espécies do gênero *Dioscorea*, existem ainda poucos estudos na literatura. Entre os tipos de marcadores diferentes, os microssatélites são considerados mais eficientes para a caracterização de germoplasma de inhame (MIGNOUNA et al., 2003), possivelmente devido à sua natureza altamente polimórfica e codominante. Acessos de *D. rotundata* foram avaliados por Mignouna et al. (2003) utilizando nove iniciadores SSR desenvolvidos para batata (*Solanum tuberosum*), além de outros marcadores (AFLP e RAPD). *D. rotundata* foi também avaliada com seis iniciadores SSR por Scarcelli et al. (2005), concluindo inclusive, a partir da segregação desses marcadores, além de dois locos isoenzimáticos, que os acessos avaliados desta espécie eram diplóides.

O desenvolvimento dos locos microssatélites pode se basear no aproveitamento de iniciadores desenvolvidos para outras espécies, os quais, devido à natureza conservada das seqüências flanqueadoras dos microssatélites, podem ser transferidos de um grupo para outro. Esta característica é denominada de transferibilidade ou amplificação heteróloga (PENHA, 2007). Tostain et al. (2006) desenvolveram 16 iniciadores para a espécie cultivada *D. alata* e para as espécies selvagens *D. abyssinica* e *D. praehensilis*, havendo possibilidade de transferência para as espécies cultivadas *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. bulbifera*, *D. trifida* e *D. nummularia*. Posteriormente, Hochu et al. (2006) desenvolveram oito iniciadores específicos para *D. trifida*, sendo que seis desses também amplificaram regiões de microssatélites em outras quatro espécies: *D. alata*, *D. cayenensis/rotundata*, *D. abyssinica* e *D. praehensilis*. Bousalem et al. (2006) avaliaram a segregação de oito locos SSR em *D. trifida*, e juntamente com análises citogenéticas, concluíram que esta é uma espécie autotetraplóide. Arnau et al. (2009) fez um estudo de revisão sobre a ploidia de *D. alata* avaliando 110 acessos de inhame do CIRAD (International center of Agricultural Research for Development) e os resultados forneceram a evidência genética para estabelecer a diploidia das plantas com $2n = 40$ cromossomos e para apoiar a hipótese de que plantas com $2n = 40$, 60 e 80 cromossomos são diplóides, triplóides e tetraplóides, respectivamente, e que o número cromossômico básico de *D. alata* é $x = 20$. Obidiegwu et al. (2009) utilizaram 219 acessos de *Dioscorea cayenensis/D. rotundata* para estudos de diversidade genética, usando 15 locos e

que revelou alta diversidade e um alto potencial para programas de melhoramento genético. Siqueira et al. (2011) desenvolveram 14 iniciadores para *D. alata*, sendo que destes nove apresentaram polimorfismo, e foram analisados 80 acessos provenientes de quatro regiões brasileiras (Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste), e também foram realizados testes de transferibilidade para as espécies *D. bulbifera*, *D. cayenensis/D. rotundata* e *D. trifida*, sendo que seis destes iniciadores mostraram entre 33% a 100%. Silva (2011) desenvolveu 11 iniciadores para as espécies *D. cayenensis* e *D. rotundata*, sendo que 10 destes iniciadores mostraram-se polimórficos e foram utilizados para avaliar a diversidade entre 22 acessos de *D. cayenensis* e 26 acessos de *D. rotundata*. Sartie et al. (2012) caracterizaram um banco de germoplasma do IITA (International Institute of Tropical Agriculture) com 53 variedades locais e sete variedades melhoradas (*D. alata*, *D. cayenensis/D. rotundata* e *D. dumetorum*), de várias partes da África, com 32 iniciadores, que demonstraram maior diversidade entre espécies do que dentro das espécies.

Até a presente data, não existem publicações científicas usando iniciadores específicos de microssatélites para a espécie *D. bulbifera*, o que torna este trabalho de grande valia para futuros estudos da espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram coletados acessos da espécie *Dioscorea bulbifera* nos estados de Mato Grosso (Tangará da Serra), Goiás (Pirenópolis), Minas Gerais (Conceição dos Ouros), Pernambuco (Camucim São Félix), Piauí (Regineração) e São Paulo (Anhembi, Campinas, Cananéia, Iguape, Iporanga, Pirassununga, São José dos Campos, São Luiz do Paraitinga e Ubatuba) (Tabela 1) (Figura 9).

Os materiais coletados foram trazidos para o Departamento de Genética da ESALQ/USP, onde foram multiplicados juntamente com acessos obtidos de outras instituições de pesquisa e materiais comerciais adquiridos em varejões. Esses acessos vêm sendo mantidos em área experimental do Departamento de Genética. Os tubérculos foram plantados em vasos e mantidos em casa de vegetação e posteriormente levados a campo experimental.

Figura 9 - Mapa do Brasil com os pontos de coletas de *D. bulbifera* (Elaborado por Luiz Rodrigues)

3.2 Extração e Quantificação de DNA

Foram testados vários protocolos de extração de DNA, a fim de obter uma qualidade e quantidade satisfatória de DNA. Entre os protocolos podemos citar Doyle e Doyle (1990) e Sharma et al. (2008), e o kit de extração da Promega (Promega, Madison, Wisconsin, USA). No entanto, após os testes realizados, optou-se por utilizar um kit de extração (DNeasy® Plant Mini Kit), da empresa Qiagen (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

As extrações foram feitas utilizando material previamente liofilizado, com adição de PVP em uma das etapas do processo, a fim de eliminar compostos fenólicos e polissacarídeos. Com o material já macerado adicionou-se 420µL do tampão AP1 (fornecido no kit) juntamente com 4µL de RNase, submeteu-se as amostras ao vortex e as incubou a 65°C por 10 minutos, misturando por inversão de 2 a 4 vezes neste período— esta etapa visa lisar a célula. No mesmo microtubo de 1,5mL foram adicionados 130µL do tampão AP2 (também fornecido no kit) e as amostras foram incubadas por 5 minutos, no gelo, e posteriormente, centrifugadas a 14.000 RPM por 5 minutos – esta etapa visa precipitar as proteínas e polissacarídeos. Coletou-se então o sobrenadante, transferindo-o para um QIAshredder Mini spin column (uma espécie de microtubo com um filtro – também fornecido no kit) e centrifugou-se a 14.000 RPM – esta coluna visa filtrar a maior parte dos precipitados presentes no DNA. Transferiu-se este material para um novo microtubo e adicionou-se 1/5 do volume de AP3 (fornecido no kit) e com a própria pipeta misturou-se este tampão ao DNA. Feito isso pipetou-se 650µL desta mistura para outro microtubo também fornecido pelo kit e centrifugou-se a 8.000 RPM por 1 minuto (este passo é feito por 2 vezes). O filtro deste microtubo foi transferido a um novo microtubo, adicionou-se 500µL do tampão AW e submeteu-se as amostras por 1 minuto de centrifugação a 8.000 RPM – este passo garante que o etanol presente no tampão AP3 evapore e não interfira na qualidade do DNA (passo repetido por 2 vezes, sendo que a segunda centrifugação foi a 14.000 RPM). Por fim, transferiu-se o material a um novo microtubo, adicionando 100µL do tampão AE (fornecido no kit), incubando por 5 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente, centrifugando-se por 1 minuto, a 8.000 RPM, armazenando o material preferencialmente em geladeira, evitando o congelamento das amostras.

Tabela 1 - Acessos de *Dioscorea bulbifera*, na qual é apresentado o número de acesso, a identificação no Banco de Germoplasma da ESALQ/USP, o município e a comunidade da coleta e o nome popular

Nº	Acesso	Município	Comunidade	Nome popular
1	DGC-25	Iguape-SP	Momuna	cará moela
2	DGC-30	Iguape-SP	Peropava	cará moela
3	DGC-35	Campinas-SP	(IAC)	áspero normal
4	DGC-54	Cananéia-SP	Agrossolar	cará paquera
5	DGC-58	Cananéia-SP	Aroeira	cará moela
6	DGC-63	Cananéia-SP	Porto Cubatão	cará moela
7	DGC-65	Cananéia-SP	Prainha	cará moela
8	DGC-66	Cananéia-SP	Prainha	cará moela
9	DGC-102	Iporanga-SP	Betari	cará paquera
10	DGC-118	Iporanga-SP	Amapá	"var. comercial"
11	DGC-122	Anhembi-SP	-	-
12	DGC-134	Tangara da Serra-MT	-	-
13	DGC-169	Regineração-PI	Chapada Gugel	inhame figo
14	DGC-218	Ubatuba-SP	Fazenda da Caixa	cará moela
15	DGC-219	Ubatuba-SP	Sertão Ubatumirim	cará moela
16	DGC-220	Ubatuba-SP	Quilombo Camburi	cará moela
17	DGC-221	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	cará moela
18	DGC-222	Ubatuba-SP	Sertão das Cutias	cará moela
19	DGC-223	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	cará moela
20	DGC-224	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	cará moela
21	DGC-225	Ubatuba-SP	Sertão do Ingá	cará moela
22	DGC-227	Ubatuba-SP	Rio Escuro	cará moela
23	DGC-230	Ubatuba-SP	Sertão do Quina	cará moela
24	DGC-244	São José dos Campos-SP	-	cará moela
25	DGC-245	Pirenópolis-GO	(feira local)	cará moela
26	DGC-273	Camucim São Félix-PE	Santa Lusía	cará moela
27	DGC-274	Conceição dos Ouros-MG	B. dos Cesários	cará de árvore
28	DGC-275	Conceição dos Ouros-MG	B. do Sertãozinho	cará de cipó
29	DGC-276	Conceição dos Ouros-MG	B. do Sertãozinho	cará de árvore
30	DGC-277	Conceição dos Ouros-MG	B. dos Pereiras	cará de árvore
31	DGC-280	Conceição dos Ouros-MG	B. das Três Cruzes	cará fígado
32	DGC-317	Iguape-SP	Peropava	cará moela
33	DGC-373	Conceição dos Ouros-MG	B. dos Barbosas	cará moela
34	DGC-375	Conceição dos Ouros-MG	B. Bernardino	cará moela
35	DGC-376	Conceição dos Ouros-MG	Bairro Maias	cará moela
36	DGC-379	Conceição dos Ouros-MG	B. Barro Branco	cará moela
37	DGC-380	Conceição dos Ouros-MG	B. Campo do Meio	cará de árvore
38	DGC-381	Conceição dos Ouros-MG	B. Campo do Meio	cará cipó
39	DGC-383	São José dos Campos-SP	-	-
40	DGC-384	Conceição dos Ouros-MG	B. Rib. Pequeno	cará
41	DGC-385	Conceição dos Ouros-MG	B. Rib. Pequeno	cará de árvore
42	DGC-387	São Luiz do Paraitinga-SP	-	-

O DNA obtido foi quantificado em géis de agarose 1%, usando um DNA padrão, corados com o corante *Blue Green* e fotodocumentados (Figura 10).

Figura 10 - Gel de agarose 1% para quantificação de DNA extraído de *D. bulbifera*, utilizando DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Material quantificado em junho de 2010

3.3 Caracterização com marcadores microssatélites heterólogos

3.3.1 Amplificação dos locos microssatélites - heterólogos

Inicialmente testou-se a transferibilidade de iniciadores desenvolvidos para outras espécies de *Dioscorea* spp., uma vez que ainda não haviam sido desenvolvidos iniciadores específicos. Quatorze iniciadores pré-estabelecidos por Tostain et al. (2006) e Hochu et al. (2006) foram utilizados para a análise de transferibilidade (Tabela 2).

Para estabelecer as condições de amplificação dos locos SSR, foi utilizada a metodologia PCR-Touchdown, onde a temperatura de anelamento é diminuída na medida em que se aumenta o número de ciclos da reação, sendo assim, as sequências iniciadoras terão probabilidade maior de se alinhar com os seus sítios de reconhecimento com uma maior especificidade nos ciclos iniciais. Para as reações de amplificação foi utilizado o termociclador modelo MyCycler Thermal Cycler da BioRad, utilizando as seguintes etapas: uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida de 10 ciclos de pré-amplificação [30 segundos a 95°C, 30 segundos a temperatura inicial de anelamento de 60°C diminuindo 1°C a cada ciclo, 50 segundos a 72°C], depois 30 ciclos de desnaturação [30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, 50 segundos a 72°C], e uma fase final de extensão de 5 minutos a 72°C.

Tabela 2 - Relação dos iniciadores de microssatélites testados e tamanho e amplitude de tamanho esperadas das bandas em pares de base (pb)

Locos	Seqüências dos iniciadores	Tamanho (pb)	Amplitude de tamanho das bandas (pb)
Da1A01*	F: TAT AAT CGG CCA GAG G R: TGT TGG AAG CAT AGA GAA	204	212-236
Da1D08*	F: GAT GCT ATG AAC ACA ACT AA R: TTT GAC AGT GAG AAT GGA	300	320-358
Dab2C05*	F: CCC ATG CTT GTA GTT GT R: TGC TCA CCT CTT TAC TTG	190	168-198
Dab2D06*	F: TGT AAG ATG CCC ACA TT R: TCT CAG GCT TCA GGG	174	155-285
Dpr3D06*	F: ATA GGA AGG CAA TCA GG R: ACC CAT CGT CTT ACC C	151	144-156
Dpr3F04*	F: AGA CTC TTG CTC ATG T R: GCC TTG TTA CTT TAT TC	128	115-127
Dpr3F12*	F: TCC CCA TAG AAA CAA AGT R: TCA AGC AAG AGA AGG TG	178	162-171
Dpr3F10*	F: TCA AAG GAA TGT TGG G R: ACG CAC ATA GGG ATT G	166	137-174
Ym-19*	F: CCA CCC TCT ACC TCA AGT R: GAG GCT TCT CCC ACT AAG T	-	-
MTI1**	F: AGCACAAGGAATGATGACTAAA R: TGGCATTGTCATAAGACCT	201	189-201
MTI2**	F: TCATCAAGAGCATCAAAAAAC R: GCCTCGTCTTTGAAGTTGGT	128	119-131
MTI3**	F: ATAACAAACAAAAAATGAAAC R: TAACAGTGATTGAGCTAGGA	185	131-204
MTI4**	F: ACTTGGTGTGTTGGATTGC R: TATCACTCCCCAGACCAGA	119	101-118
MTI8**	F: GGAGAGACGCCAGAAGATG R: TATCCATCCCACCAAAAAT	140	136-140
MTI10**	F: TCGTGTCCATCTTGCTGCGT R: GAAAAGCGGAGATGAAGAGCA	176	158-178
MTI11**	F: CTCTTTTGCTTCTCATTTCA R: ATGTAGCCAATCCAAAATAG	130	127-145
MTI12**	F: CTGCCAGCGTTCCGATTC R: CGTAGGACCTCTCGCATCAG	122	101-125

* Tostain et al. (2006); ** Hochu et al. (2006)

As reações de amplificação foram modificadas, conforme sugerido por Tostain et al. (2006) e Hochu et al. (2006). As reações tiveram volume final de 10 μ L, contendo as seguintes mistura de soluções:

- ❖ Para iniciadores desenhados por Tostain et al. (2006): 0,1 μ L de TAQ-Polimerase (5 U/ μ L); 1 μ L de Tampão (10X); 0,8 μ L MgCl₂ (25mM); 0,6 μ L de iniciador F (10 pmoles/ μ L); 0,6 μ L de iniciador R (10 pmoles/ μ L); 1 μ L de dNTP (2 mM de cada); 3,9 μ L de H₂O Milli-Q e 2 μ L de DNA (10 ng/ μ L) em cada tubo.
- ❖ Para iniciadores desenhados por Hochu et al. (2006): 0,1 μ L de TAQ-Polimerase (5 U/ μ L); 1 μ L de Tampão (10X); 0,8 μ L MgCl₂ (25mM); 0,1 μ L de iniciador F (10 pmoles/ μ L); 0,4 μ L de iniciador R (10 pmoles/ μ L); 1 μ L de dNTP (2 mM de cada); 4,6 μ L de H₂O Milli-Q e 2 μ L de DNA (10 ng/ μ L) em cada tubo.

3.3.2 Eletroforese do produto amplificado

Os produtos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida desnaturante 7%, em cuba vertical (Model C.B.S. Scientific Dual Unit). As duas placas utilizadas foram limpas com álcool e somente após esse procedimento foram tratadas para receber o gel. A placa menor (33x39 cm) foi impregnada com 5 μ L de metacriloxipropil-trimetoxilano (Bind Silane, Amersham Biosciences) diluído em 5 μ L de ácido acético glacial e 1,5 mL de álcool absoluto. Já a placa maior (33x41,5 cm) foi impregnada com 2 mL de dimetildiclorosilano octametil ciclo-octasilano (Plus One Repel Silane ES, Amersham Biosciences). Para o preparo do gel utilizou-se uma solução de poliacrilamida (110 μ L de acrilamida [7% uréia 7M, 138 μ L de TEMED e 660 μ L de persulfato de amônio a 10%]).

Após em média, duas horas de polimerização, as placas foram pré-aquecidas por 50 minutos a 70W. Com as placas aquecidas aplicou-se 4 μ L das amostra previamente desnaturadas a 95°C por 5 minutos, juntamente com um tampão de carregamento (95% formamida, 0.05% de xylenicynol, 0,05% de azul de bromofenol, 12,5% de sacarose e 10 mM de NaOH). Foi utilizado como marcador de peso molecular um *ladder* de 10 pb, e a corrida teve um tempo médio de quatro horas (tempo que depende entre os iniciadores), a 70W e 1800V.

Para visualizar as bandas amplificadas utilizou-se um protocolo proposto por Creste et al. (2001), que utiliza nitrato de prata, com algumas modificações (CARRASCO, 2012):

- ❖ Fixação: a placa foi imersa em solução de etanol 10% e ácido acético 1% por 15 minutos sob agitação, seguida de uma lavagem com água destilada por 1 minuto;
- ❖ Impregnação com prata: a impregnação foi feita em solução de nitrato de prata 0,1% durante 20 minutos, sob agitação e protegido de luz;
- ❖ Revelação: a placa foi imersa e agitada em uma solução contendo 15g de hidróxido de sódio e 2 ml de formaldeído diluído em 1L de água destilada, até que seja possível a visualização das bandas.

Após a etapa de revelação, as placas com os géis foram levados ao transluminador onde os padrões de bandas de microssatélites foram interpretados e fotodocumentados.

3.4 Desenvolvimento de marcadores microssatélites

3.4.1 Construção de biblioteca genômica enriquecida

A construção da biblioteca genômica para o desenvolvimento dos iniciadores para a espécie *D. bulbifera* foi realizada no curso “Construção de bibliotecas enriquecidas em microssatélites eucariotos”, no CBMEG/UNICAMP, sob a supervisão da Profa. Dra. Anete Pereira de Souza.

A construção da biblioteca genômica enriquecida foi realizada utilizando um dos genótipos pertencentes ao banco de germoplasma da *Dioscorea* spp. da ESALQ/USP, cuja a metodologia de extração encontra-se no item 3.2.

Os microssatélites podem ser isolados por meio de métodos tradicionais de construção de bibliotecas genômicas enriquecidas usando sondas complementares aos motivos. A metodologia utilizada neste estudo foi desenvolvida por Billotte et al. (1999) e consiste de cinco etapas primordiais: a) digestão de DNA; b) amplificação com os adaptadores; c) enriquecimento por hibridização utilizando estreptavidina magnética, onde os fragmentos com microssatélites se hibridizam com oligonucleotídeos ligados às esferas magnéticas (*beads*), que são atraídas por um ímã; d) clonagem; e por fim, e) sequenciamento. A seguir, um pouco mais detalhamento deste procedimento (Figura 11):

- ❖ O DNA extraído foi digerido com enzima de restrição *RsaI*, e os fragmentos digeridos foram ligados a adaptadores *RsaI*. A biblioteca foi enriquecida com sequências de dinucleotídeos usando iniciadores biotinizados (CT)₈ e (GT)₈, em seguida capturados com sondas magnéticas cobertas de partículas de streptavidina (MagneSphere Magnetic Separation Products, Promega);
- ❖ Os fragmentos contendo microssatélites foram selecionados e amplificados via reação de polimerase em cadeia (PCR) usando iniciadores com adaptadores e depois ligados a vetores pGEM-T (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Para realização da clonagem foi utilizada linhagem de células XL-1 Blue de *Escherichia coli*. As células transformadas foram cultivadas em placas contendo agar, 100 g.ml⁻¹ de ampicilina, 50 g.ml⁻¹ de X-galactosidade e Isopropyl b-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG). As colônias brancas foram selecionadas e estocadas em freezer a -80 °C;
- ❖ Das colônias recombinantes obtidas, 84 foram sequenciadas utilizando o kit de sequenciamento Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no sequenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Figura 11 - Construção de biblioteca genômica enriquecida de microssatélites através de hibridização seletiva. Adaptado por Grando (2009), de Zane et al. (2002)

3.4.2 Análise das sequências e desenho dos iniciadores

Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram analisadas e editadas no programa SeqmanTMII (Pacote DNASTar Inc.). Este programa forma *contigs* a partir de dois ou mais *reads* e elimina os dados de má qualidade diretamente a partir de diversos sequenciadores automáticos.

Depois foi feita a exclusão das sequências do clone e dos adaptadores, utilizando o programa livre MICROSAT (CIRAD-França). Feito isso, foi realizada a identificação das regiões que contém microssatélite, utilizando um programa online e grátis, disponível em <http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool>.

Encontradas as sequências com microssatélites, os iniciadores foram desenhados para estes marcadores. O programa usado nesta etapa do estudo foi o PrimerSelect, também do Pacote DNASTar Inc., com as seguintes condições: tamanho do fragmento de 100 a 300 pb; conteúdo de GC entre 40 e 60 %; temperatura de anelamento entre 45 e 60 °C; tamanho do primer entre 18 e 22 pb; ausência de hairpins ou dímeros.

3.4.3 Amplificação dos locos microssatélites

A caracterização dos locos foi realizada com oito iniciadores sintetizados a partir da construção da biblioteca genômica enriquecida (Tabela 3).

Para extração do DNA genômico foi utilizado o kit DNeasy® Mini Plant, da Qiagen, como descrito anteriormente.

Como para a caracterização dos iniciadores heterólogos, para os iniciadores específicos também foi utilizada a metodologia PCR-Touchdown.

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

Tabela 3 - Relação dos iniciadores SSR específicos de *Dioscorea bulbifera*, tamanho (pb) e amplitude de tamanho de bandas (pb)

Locos	Sequências dos <i>primers</i>	Tamanho (Pb)	Amplitude de tamanho das bandas (pb)
Db1	F: GGGAAGAAAAGCGAAAGGAG R: CTGGCGTAATAGCGAAGAGG	177	178 – 192
Db2	F: CACGACCTCCTGGAAGACAAC R: ATATAGCACGGGAGGCACAAAC	110	105 – 109
Db3	F: TTTTACCCAGGATTTAGAAGAA R: GGACTGGAGCCACAAGATT	279	220 – 280
Db4	F: TCTCGCTGTTCTCGTGTTCTTC R: GTCCGATTTGATGGTGCTTCTC	194	162 – 200
Db5	F: TGTCTATTATATTGCTCTTTCT R: CGTTTCTAATTTCTGGGTAT	284	260 – 280
Db6	F: AAGCCGGTATCATTCAACAAAA R: CCCTCGCCAACATCAAGTAA	170	162 – 175
Db7	F: CCGCAAGGCTCAAAAAGTTAGG R: TCGTGGATGAAGATGGGTGGAC	103	102 – 104
Db8	F: TCCCAAGAAATCCAGAATA R: ATGCATGCCAAAACAAATA	139	141 – 149

As reações de amplificação foram padronizadas e tiveram volume final de 10µL, contendo a seguinte mistura de soluções:

- ❖ 3,9µL de H₂O Milli-Q;
- ❖ 1,45µL MgCl₂ (25mM);
- ❖ 1,35µL BSA 5% (Albumin, bovine serum)
- ❖ 1,2µL de Tampão (10X);
- ❖ 1µL de dNTP (25 mM de cada);
- ❖ 0,4µL de iniciador (primer) F (10 pmoles/µL) e 0,4µL de iniciador R (10 pmoles/µL);
- ❖ 0,4µL de TAQ-Polimerase (2,5U/µl);
- ❖ 2µL de DNA (10 ng/µL) em cada tubo.

Os produtos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida desnaturante 7%, em cuba vertical (Model C.B.S. Scientific Dual Unit). E corados seguindo o protocolo Creste et al. (2001), com modificações (CARRASCO, 2012), como descrito anteriormente (3.3.2).

3.5 Análise genético-estatística

Por tratar-se de materiais poliplóides, as bandas de microssatélites foram avaliadas como presença/ausência de bandas, como se fossem marcadores dominantes. Foi obtido, para o conjunto de acessos avaliado, o número de bandas (alelos) por loco, o número de bandas polimórficas e a porcentagem de polimorfismo, baseada nos dois parâmetros citados anteriormente. Para comparar a eficiência dos marcadores na identificação dos genótipos, foi estimado para cada iniciador o parâmetro D (TESSIER et al., 1999), que confere o poder de discriminação de cada iniciador. Este parâmetro foi calculado de acordo com a fórmula:

$D_j = 1 - C_j = 1 - \sum_{i=1}^I p_i \frac{(Np_i - 1)}{N - 1}$, onde D é a probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente padrões de bandas distintos; C é a probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente possuem um padrão de bandas similar; e N é o número de indivíduos analisado.

Para a discriminação entre as diversas variedades amostradas, foram realizadas análises de coordenadas principais e de agrupamento, utilizando para esta última o coeficiente de similaridade de Jaccard (ALFENAS, 1998), empregando o software PAST (HAMMER et al., 2001). A precisão dos agrupamentos foi estimada a partir de simulações com reamostragens, por meio de 10.000 *bootstraps*. O software PopGene (versão 1.32) (YEH et al., 1997) foi utilizado para estimar o Índice de Shannon e a heterozigosidade esperada (H_E).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de DNA

Foram testados quatro métodos de extração de DNA a partir de folhas jovens de *D.bulbifera*: Doyle e Doyle (1991), Sharma et al. (2008) e Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wiscosin, USA).

Estas metodologias não apresentaram resultados satisfatórios, pois não retiraram grande quantidade de compostos fenólicos e polissacarídeos, e *D. bulbifera* tem como característica ter uma grande quantidade desses elementos, e sabe-se que a presença tanto de compostos fenólicos como polissacarídeos diminui consideravelmente a qualidade do DNA para técnica de PCR, por inibir a atividade da *Taq* DNA polimerase.

Por fim, optou-se por utilizar o DNeasy® Plant Mini Kit, um kit de extração comercial, da empresa Qiagen (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), que apresentou os melhores resultados, tanto em qualidade de DNA como em quantidade. A quantidade de DNA extraído variou entre 10 e 100 nanogramas por μL .

4.2 Desenvolvimento de marcadores microssatélites

A partir da biblioteca genômica desenvolvida, foram obtidas e sequenciadas 86 colônias (clones), contendo o inserto. Deste total, 21 sequências apresentaram microssatélites, o que representa um enriquecimento de 24,41% da biblioteca. A maioria dos motivos de repetição foi classificada como dinucleotídeos.

No total foram encontradas 26 regiões contendo microssatélites, porém, algumas regiões foram descartadas da análise, visto que estavam localizadas próximas as extremidades, impedindo assim o desenho do iniciador.

Dentre os 26 microssatélites obtidos, sintetizaram-se sete marcadores SSR, apresentados na Tabela 4. O desenho dos iniciadores restantes não foi possível devido a sequências de baixa qualidade.

Todos os marcadores SSR sintetizados apresentaram amplicons, e apenas um se apresentou monomórfico nos genótipos utilizados neste estudo. A percentagem de enriquecimento dos clones positivos obtidos a partir da construção da biblioteca enriquecida foi alta (24,41%) de acordo com o protocolo descrito por Billote et al. (1999), que considera

alto o enriquecimento acima de 20%. Silva (2011) desenvolveu duas bibliotecas enriquecidas para *D. cayenensis*, obtendo 14% para a primeira e 12% para a segunda.

A classe mais frequente foi a dinucleotídeos, que dos iniciadores desenhados, corresponde a seis microssatélites. Essa predominância também foi encontrada para *D. cayenensis* (SILVA, 2011) e *D. alata* (SIQUEIRA, 2011). Os locos microssatélites de nucleotídeos perfeitos são ideais para obtenção de marcas altamente informativas por apresentarem níveis maiores de polimorfismo, por conta da taxa de mutação ser superior aos tri- e tetranucleotídeos, e por isso são amplamente utilizados em estudos genéticos (ELLEGREN, 2004).

Tabela 4 - Iniciadores sintetizados para *Dioscorea bulbifera*, incluindo o nome dos iniciadores, sua sequência, número de acesso no GenBank, temperatura de anelamento (Ta), tamanho do iniciador em pares de base, o motivo, e o tipo de microssatélite

Nome	Sequência	Número GenBank	Ta (°C)	Produto (pb)	Motivo	Classificação
Db2	F: CACGACCTCCTGGAAGACAAC R: ATATAGCACGGGAGGCACAAAC	KC110758	53°C	214	(GAC) ₄	Perfeito
Db3	F: TTTTACCCAGGATTTAGAAGAA R: GGACTGGAGCCACAAGATT	KC110759	50°C	279	(CA) ₈	Perfeito
Db4	F: TCTCGCTGTTCTCGTGTTCTTC R: GTCCGATTTGATGGTGCTTCTC	KC110760	55°C	194	(GA) ₁₇	Perfeito
Db5	F: TGTCTATTATATTGCTCTTTCT R: CGTTTCTAATTTCTGGGTAT	KC110761	50°C	284	(GT) ₄	Perfeito
Db6	F: AAGCCGGTATCATTCAACAAAA R: CCCTCGCCAACATCAAGTAA	KC110762	53°C	170	(AC) ₈	Perfeito
Db7	F: CCGCAAGGCTCAAAAAGTTAGG R: TCGTGGATGAAGATGGGTGGAC	KC110763	53°C	104	(GA) ₄	Perfeito
Db8	F: TCCCAAGAAATCCAGAATA R: ATGCATGCCAAAACAAATA	KC110764	50°C	139	(TG) ₈	Perfeito

4.3 Caracterização e genotipagem dos microssatélites

Os 42 indivíduos de *D. bulbifera* foram caracterizados para 25 iniciadores (Tabela 5), sendo que destes, nove iniciadores foram descritos por Tostain et al.(2006), para outras espécies de *Dioscorea*, oito foram descritos por Hochu et al. (2006) para *D. trifida*, ou seja, 17 iniciadores heterólogos, e sete foram desenvolvidos especialmente para *D. bulbifera* no presente estudo (Tabela 5).

Entre os iniciadores para amplificação heteróloga, obteve-se amplificação satisfatória para cinco iniciadores descritos por Tostain et al. (2006) e cinco iniciadores obtidos por Hochu et al. (2006). Já entre os iniciadores desenvolvidos via biblioteca enriquecida para *D. bulbifera* todos obtiveram amplificação (Tabela 5). Foram, portanto, utilizados para as genotipagens dos acessos de *D. bulbifera* um total de 18 iniciadores, dez heterólogos e oito específicos.

A eficiência dos locos heterólogos de SSR desenvolvidos para outras espécies do gênero *Dioscorea* para *D. bulbifera* foi de 58,2% (10 locos com amplificação positiva em 17 tentativas de transferência). Todos os locos foram polimórficos. A possibilidade de transferibilidade de iniciadores SSR entre espécies é uma grande vantagem, visto que o custo para desenvolvimento de iniciadores específicos é bastante alto. Tostain et al. (2006) desenvolveram iniciadores para três espécies de *Dioscorea* (*D. alata*, *D. abyssinica*, *D. praehensilis*) e estes iniciadores obtiveram resultados satisfatórios para a transferibilidade para outras cinco espécies (*D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. nummularia*, *D. bulbifera* e *D. trifida*). Hochu et al. (2006) desenvolveram iniciadores para *D. trifida*, que apresentaram transferibilidade para quatro outras espécies (*D. cayenensis*, *D. abyssinica*, *D. praehensilis* e *D. alata*). Siqueira et al. (2011) desenvolveram nove iniciadores para *D. alata* e testaram a amplificação cruzada para três espécies (*D. cayenensis-rotundata*, *D. trifida* e *D. bulbifera*), obtendo amplificações positivas para sete iniciadores.

Já entre os sete locos SSR desenvolvidos para *D. bulbifera* todos apresentaram amplificações positivas, e apenas um se apresentou monomórfico (Db7). Até a recente data, nenhum marcador microssatélite havia sido desenvolvido para esta espécie e também nenhum trabalho foi publicado utilizando SSR para caracterização de diversidade genética em *D. bulbifera*.

Tabela 5 – Relação de iniciadores amplificados, sua sequência, temperatura de anelamento (Ta), motivo, número de alelos e amplitude alélica em pares de bases

Locos	Sequência	Ta (°C)	Motivo	Nº de alelos	Amplitude alélica (pb)
Db2	F: CACGACCTCCTGGAAGACAAC R: ATATAGCACGGGAGGCACAAAC	53	(GAC) ₄	3	105 – 109
Db3	F: TTTTACCCAGGATTTAGAAGAA R: GGACTGGAGCCACAAGATT	50	(CA) ₈	4	220 – 280
Db4	F: TCTCGCTGTTCTCGTGTCTTC R: GTCCGATTTGATGGTGCTTCTC	55	(GA) ₁₇	4	162 – 200
Db5	F: TGTCTATTATATTGCTCTTTCT R: CGTTTCTAATTTCTGGGTAT	50	(GT) ₄	3	260 – 280
Db6	F: AAGCCGGTATCATTCAACAAAA R: CCCTCGCCAACATCAAGTAA	53	(AC) ₈	4	162 – 175
Db7	F: CCGCAAGGCTCAAAAAGTTAGG R: TCGTGGATGAAGATGGGTGGAC	53	(GA) ₄	2	102 – 104
Db8	F: TCCCAAGAAATCCAGAATA R: ATGCATGCCAAAACAAATA	50	(TG) ₈	2	141 - 149
Da1A01*	F: TAT AAT CGG CCA GAG G R: TGT TGG AAG CAT AGA GAA	51	(GT) ₈	2	187 – 203
Dab2C05*	F: CCC ATG CTT GTA GTT GT R: TGC TCA CCT CTT TAC TTG	51	(GA) ₁₉	4	177 – 183
Dab2D06*	F: TGT AAG ATG CCC ACA TT R: TCT CAG GCT TCA GGG	51	(CT) ₁₉	3	190 - 240
Dpr3F12*	F: TCC CCA TAG AAA CAA AGT R: TCA AGC AAG AGA AGG TG	51	(GA) ₁₆	4	168 – 190
Dpr3F10*	F: TCA AAG GAA TGT TGG G R: ACG CAC ATA GGG ATT G	51	(GA) ₁₉	3	148 - 160
MTI1**	F: AGCACAAGGAATGATGACTAAA R: TGGCATTGTCATAAGACCT	50	(TTG) ₅	6	175 – 212
MTI2**	F: TCATCAAGAGCATCAAAAAAC R: GCCTCGTCTTTGAAGTTGGT	50	(CAA) ₆	5	111 – 116
MTI8**	F: GGAGAGACGCCAGAAGATG R: TATCCATCCCACCAAAAAT	50	(AGG) ₇	4	177 – 196
MTI11**	F: CTCTTTTGCTTCTCATTTCA R: ATGTAGCCAATCCAAAATAG	55	(CAA) ₇	6	123 – 134
MTI12**	F: CTGCCAGCGTTCCGATTC R: CGTAGGACCTCTCGCATCAG	55	(CTT) ₈	4	103 - 109

* Tostain et al.(2006); ** Hochu et al.(2006)

4.4 Análises de diversidade genética

A amplificação dos locos resultou em um total de 63 alelos (bandas), variando de duas a seis alelos por loco, com média de 3,7 alelos por loco. E com exceção do loco Db7, todos os demais foram polimórficos. Siqueira (2011) obteve uma média de 5,2 alelos por loco para *D. alata*. A média encontrada em *D. bulbifera* foi também inferior às médias encontradas por Hochu et al. (2006), Tostain et al. (2006) e Obidiegwu et al. (2009), os quais obtiveram 7,6, 7,3 e 8,4, respectivamente, em diversas espécies de *Dioscorea*. Já Sartie et al. (2012) encontrou uma média de 3,7 alelos por loco em *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. dumentorum* e *D. rotundata*.

A heterozigosidade esperada (H_E) para cada iniciador e variou de 0,08 a 0,49, com média de 0,33 (Tabela 6). O iniciador que obteve maior valor de heterozigosidade esperada foi o Dab2C05. A heterozigosidade pode ser considerada uma medida da variabilidade genética e esta medida se refere a quanta variabilidade que existe nessa população, e a forma em que essa variabilidade se distribui através dos alelos nos locos em estudo (CARRASCO, 2012). Siqueira et al. (2011) obtiveram $H_E = 0,70$ para a espécie *D. alata* e Silva (2011) encontrou $H_E = 0,64$ para *D. cayenensis*. É importante salientar que *D. bulbifera* é uma espécie de baixa rentabilidade comercial e de origem Africana/Asiática, porém, ainda assim, é possível observar que é uma espécie com uma diversidade relativamente alta.

O Índice de Shannon foi utilizado para o cálculo de diversidade genética e foram realizadas duas análises separadamente: a primeira medindo a diversidade por iniciador, e a segunda levando em conta os acessos agrupados por dois estados em que se encontrava o maior número amostral, São Paulo e Minas Gerais. Segundo Krebs (1999), o índice de Shannon (também conhecido como Shannon-Wiener) é uma medida de diversidade utilizada para determinar a quantidade de ordem existente num sistema; quanto menor o valor do índice de Shannon menor a diversidade da amostra.

Entre os iniciadores, o índice de Shannon variou entre 0,18 a 0,68, com média de 0,49, sendo o iniciador com o maior índice o Dab2D06, um iniciador desenhado para *Dioscorea abyssinica* por Tostain et al. (2006) (Tabela 6). Índices acima de 0,3 indicam que há alta diversidade. Com relação à análise por grupos de acessos, o valor do índice de Shannon foi maior em acessos do Estado de São Paulo, 0,48, enquanto que no Estado de Minas Gerais este índice foi de 0,42 (Tabela 7). Estados como Piauí, Pernambuco, Goiás e Mato Grosso com apenas um indivíduo apresentam valor 0, portanto não foram

Tabela 6 – Iniciadores utilizados para 42 acessos de *D. bulbifera*, incluindo a sequência do iniciador, número de bandas (N_B), número de bandas polimórficas (N_{BP}), porcentagem de polimorfismo (P), parâmetro D , índice de Shannon (S) e heterozigiosidade esperada (H_E)

<i>Locos</i>	<i>Sequência</i>	N_B	N_{BP}	P (%)	D	S	H_E
Db2	F: CACGACCTCCTGGAAGACAAC R: ATATAGCACGGGAGGCACAAAC	3	3	100%	0,89	0,51	0,33
Db3	F: TTTTACCCAGGATTTAGAAGAA R: GGACTGGAGCCACAAGATT	4	4	100%	0,92	0,49	0,33
Db4	F: TCTCGCTGTTCTCGTGTCTTCTC R: GTCCGATTGATGGTGCTTCTC	4	4	100%	0,96	0,51	0,35
Db5	F: TGTCTATTATATTGCTCTTTCT R: CGTTTCTAATTCTGGGTAT	3	3	100%	0,92	0,38	0,23
Db6	F: AAGCCGGTATCATTCAACAAAA R: CCCTCGCCAACATCAAGTAA	4	4	100%	0,85	0,28	0,25
Db7	F: CCGCAAGGCTCAAAAAGTTAGG R: TCGTGGATGAAGATGGGTGGAC	2	0	0%	0,93	0	0
Db8	F: TCCCAAGAAATCCAGAATA R: ATGCATGCCAAAACAAATA	2	2	100%	0,94	0,18	0,08
Da1A01**	F: TAT AAT CGG CCA GAG G R: TGT TGG AAG CAT AGA GAA	2	2	100%	0,97	0,64	0,45
Dab2C05**	F: CCC ATG CTT GTA GTT GT R: TGC TCA CCT CTT TAC TTG	4	4	100%	0,95	0,57	0,39
Dab2D06**	F: TGT AAG ATG CCC ACA TT R: TCT CAG GCT TCA GGG	3	3	100%	0,93	0,68	0,49
Dpr3F12**	F: TCC CCA TAG AAA CAA AGT R: TCA AGC AAG AGA AGG TG	3	3	100%	0,95	0,54	0,36
Dpr3F10**	F: TCA AAG GAA TGT TGG G R: ACG CAC ATA GGG ATT G	4	4	100%	0,92	0,57	0,39
MTI1***	F: AGCACAAGGAATGATGACTAAA R: TGGCATTTGGCATAAGACCT	6	6	100%	0,89	0,48	0,31
MTI2***	F: TCATCAAGAGCATCAAAAAAC R: GCCTCGTCTTTGAAGTTGGT	5	5	100%	0,70	0,67	0,48
MTI8***	F: GGAGAGACGCCAGAAGATG R: TATCCATCCCACCAAAAAT	4	4	100%	0,95	0,50	0,33
MTI11***	F: CTCTTTTGCTTCTCATTTCA R: ATGTAGCCAATCCAAAATAG	6	6	100%	0,88	0,53	0,35
MTI12***	F: CTGCCAGCGTTCCGATTC R: CGTAGGACCTCTCGCATCAG	4	4	100%	0,93	0,49	0,32

* Tostain et al, 2006; ** Hochu et al (2006)

considerados amostralmente para este índice. Silva (2011) obteve valores de 0,27 para *D. cayenensis* e 0,23 para *D. rotundata*; Siqueira (2011) obteve uma média de 0,40 para *D. alata*. Portanto, o índice de Shannon observado para *D. bulbifera* encontra-se dentro do esperado para espécies do gênero cultivadas no Brasil, e mostra que, apesar de não ser uma espécie de grande expressão econômica, mantém ainda alta diversidade, comparável com a *D. alata*, que é uma das espécies de maior importância comercial no Brasil, além de *D. cayenensis* e *D. rotundata* (VEASEY et al., 2010).

Tabela 7 – Valores do Índice de Shannon para *D. bulbifera* para os acessos originários de São Paulo e Minas Gerais

<i>Estado</i>	<i>Índice de Shannon</i>
São Paulo	0,48
Minas Gerais	0,42

Os valores do parâmetro D (poder de discriminação) foi calculado com o propósito de comparar a eficiência dos marcadores na identificação genotípica. Este parâmetro indica um maior nível de polimorfismo quando seu valor é próximo a 1 (um). Para este estudo este parâmetro variou entre 0,70 e 0,97, com média de 0,85 (Tabela 7), o que pode ser considerado um valor elevado, ou seja, pode-se afirmar que estes iniciadores tem um alto poder discriminatório, pois conseguiram detectar polimorfismo nos genótipos avaliados. Os maiores valores foram encontrados nos iniciadores Da1A01 (0,97) e Db4 (0,96). Siqueira (2011) encontrou em seu estudo para *D. alata* uma média de 0,68, menor que no presente estudo.

Na análise das coordenadas principais (Figura 12) não se observou a formação de grupos específicos, o que sugere altas taxas de fluxo gênico entre os acessos dos diferentes locais coletados. As duas primeiras coordenadas principais apresentaram um valor de 12 e 10,3% da variação total. Siqueira (2011) também não encontrou estruturação genética para *D. alata* e sugere que este resultado tem como razão a propagação vegetativa e o manejo dos agricultores que usam a prática de troca de túberas entre seus vizinhos, o que pode levar a uma mistura de genótipos.

O dendrograma utilizando o coeficiente de Jaccard (Figura 13) corrobora com o resultado alcançado pela análise de coordenadas principais, que é o não-agrupamento entre os genótipos de acordo com a origem dos materiais. Observa-se a separação em dois grupos, baseado na análise de bootstrap, separando em um sub-grupo os acessos originários de Campinas-SP (nº 3), Iporanga-SP (nº 10), Pirenópolis-GO (nº 25), Iguape-SP (nº 2) e Cananéia-SP (nº 4). Observou-se apenas três duplicatas entre os acessos avaliados, uma delas dois acessos originários de Iguape-SP (nº 1) e Cananéia-SP (nº 5), a segunda para dois acessos de Conceição dos Ouros-MG (nº 33 e 38), e a terceira para dois acessos originários de Conceição dos Ouros-MG (nº 41) e São José dos Campos-SP (nº 39). Esta última duplicata ocorreu entre acessos de locais bem distantes, mostrando o grande intercâmbio de materiais que deve existir para *D. bulbifera*. Novamente pode-se falar que isto ocorre devido à dinâmica evolutiva da espécie, que é baseada na troca de material entre os agricultores.

Existem poucos estudos com diversidade genética para *D. bulbifera* e nenhum com marcadores microssatélites. Entre esses estudos, pode-se citar Ramser et al. (2006), com plantas originárias da África, Ásia e Polinésia, que indicam que estes acessos se agrupam de acordo com sua origem geográfica. Terauchi et al. (1991) analisou *D. bulbifera* por meio de RFLP de DNA cloroplastidial e também observou uma clara distinção geográfica entre os acessos. Bressan (2005) estudou a diversidade genética de 17 acessos de *D. bulbifera* da região do Vale do Ribeira utilizando marcadores isoenzimáticos, e seus resultados também apontaram alta diversidade genética e não estruturação espacial dos acessos, concordando com os resultados do presente estudo.

Siqueira et al. (2011) também encontrou resultados bem semelhantes para acessos de *D. alata* originários de diversas regiões do Brasil. Este estudo destaca que a diversidade do inhame é resultado de práticas culturais, sociais e de uma dinâmica econômica encontrada entre comunidades locais e tradicionais e que grupos étnicos manejam essa diversidade de diferentes formas, dependendo do seu passado histórico e do contexto onde estão inseridos e seja em uma escala local ou regional, as túberas de inhame podem atingir grandes distâncias, a partir do seu local de origem, graças a fluxos migratórios. Esse transporte de túberas pode ser feito com fins comerciais, por mudança do agricultor para outro estado ou região do país, ou mesmo usando as túberas como presente entre amigos e familiares, muito comum em sociedades tradicionais (SIQUEIRA, 2011).

Malapa et al. (2005) em seu estudo, também não obtiveram distinções geográficas dos seus acessos de *D. alata*, *D. nummularia* e *D. transversa* (de origem asiática, africana e melanésia) com marcadores AFLP, o que confirma estudo anterior realizado por Lebot et al. (1998) com marcadores isoenzimáticos para *D. alata*, que indicaram que clones dessas plantas foram amplamente distribuídos. Já para *D. cayenensis-D. rotundata*, Obidiegwu et al. (2009) observaram que não houve relação dos acessos e área geográfica da coleta, e isto poderia ocorrer pelas cultivares terem sido distribuídas por grandes distâncias geográficas como clones, ao longo das migrações humanas.

Figura 12 - Gráfico de dispersão para análise de coordenadas principais utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard para 42 acessos de *Dioscorea bulbifera*, avaliados com marcadores microssatélites

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é o primeiro com marcadores microssatélites para *D. bulbifera*, e a construção de uma biblioteca enriquecida para esta espécie se provou interessante e eficiente para futuros estudos de diversidade em *D. bulbifera*, além de programas de melhoramento, visto que sua importância farmacológica a torna uma espécie com grande potencial para produção de fármacos. Além dos iniciadores específicos, os iniciadores heterólogos também mostraram grande eficiência em amostrar a diversidade genética desta espécie.

Pode-se observar também, que apesar de não se mostrar estruturada no espaço os dados apresentados neste estudo demonstram que existe grande variabilidade genética em *D. bulbifera* mantida por agricultores tradicionais de diversas partes do Brasil.

Os níveis de diversidade genética encontrados nesse estudo são extremamente úteis na delimitação de áreas de conservação de diversidade.

6 CONCLUSÕES

Os sete pares de iniciadores de microssatélites desenvolvidos para *D. bulbifera* mostraram-se apropriados para estudos de diversidade genética para esta espécie;

Existe elevada diversidade genética entre os acessos avaliados de *D. bulbifera*, mantida por agricultores tradicionais;

A diversidade observada não se encontra estruturada no espaço, o que provavelmente se deve ao intercâmbio de materiais entre agricultores.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, K.; NAIR P.G. Floral biology and artificial pollination in *Dioscorea alata* L. **Euphytica**, Dordrecht, v. 48, p. 45-51, 1990.

ALEXANDER, J.; COURSEY, D.G. **The origin of yam cultivation**. In: The domestication and exploration of plant and animals. *Edited by:* P.J. Ucko, G.W. Dimbleby. Aldine Publishing Company. Chicago. Chap. 1. 1969. pp. 405-425

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. 370 p.

AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, N.R. **Yams: handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1984. p. 327-354. (Crop Species, 3).

ARNAU, G.; NEMORIN, A.; MALEDON, E.; ABRAHAN, K. Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L. (Dioscoreaceae) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 118, p. 1239-1249, 2009.

ASEMOTA, H.N.; RAMSER, J.; LOPEZ-PERALTA, C.; WEISING, K.; KAHL, G. Genetic variation and cultivar identification of Jamaican yam germplasm by random amplified polymorphic DNA analysis. **Euphytica**, Dordrecht, v. 92, p. 341-351, 1996.

ASIEDU, R.; SARTIE, A. Crops that feed the World 1. Yams: Yams for income and food security. **Springer Science Business Media B.V. & International Society for Plant Pathology Food Security**, Netherlands, v. 2, p. 305–315, Doi: 10.1007/s12571-010-0085-0, 2010.

BAIMEY, H.; COYNE, D.; LABUSCHAGNE, N. Effect of fertilizer application on yam nematode (*Scutellonema bradys*) multiplication and consequent damage to yam (*Dioscorea* spp.) under field and storage conditions in Benin. **International Journal of Pest Management**, London, v. 52, p. 63–70, 2006.

BHARGAVA, A.; FUENTES, F.F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 44, p. 250–266, 2010.

BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite – enriched libraries: applied methodology for the development of SSRs markers in tropical crops. **Fruits**, Le Ullis, v. 54, p. 277-288, 1999.

BOUSALEM, M.; ARNAU, G.; HOCHU, I.; ARNOLIN, R.; VIADER, V.; SANTONI, S.; DAVID, J. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the Dioscoreae. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, p. 439–451, 2006.

BRENAC, P.; SAUVAIRE, Y. Accumulation of sterols and steroidal sapogenins in developing fenugreek pods: possible biosynthesis in situ. **Phytochemistry**, New York. v.29, n.2, p. 415-422, 1996.

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

BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A.; PERONI, N.; FELIPIM, A.P.; SANTOS, K.M.P. Collecting yam (*Dioscorea* spp.) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) germplasm in traditional agriculture small-holdings in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, v.144, p.8-13, 2005

BRESSAN, E.A. ; BRINER NETO, T. ; ZUCCHI, M.I. ; RABELLO, R.J. ; VEASEY, E.A. Morphological variation and isozyme diversity in *Dioscorea alata* L. landraces from Vale do Ribeira, Brazil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, p. 494-502, 2011.

BURKILL, I.H. The organography and the evolution of the Dioscoreaceae, the family of the yams. **Journal of the Linnean Society**, London, v. 56, p. 319-412, 1960.

CARMO, C.A.S. **Inhame e taro**: sistemas de produção familiar. Vitória, ES: Incaper, 2002. 289p.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). **Raíces y tubérculos en el sistema alimentario mundial: visión al 2020**. Informe anual. Lima. Disponível em: http://www.cipotato.org/market/ARs/Ar99e/vision_e.htm Acesso: 20 jun. 2010.

CARRASCO, N.F. **Diversidade genética de variedades tradicionais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivada em comunidades da baixada cuiabana em Mato Grosso, por meio de marcadores microssatélites**. 2012. 99p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CARVALHO, P.C.L.; TEIXEIRA, C.A. & BORGES, A.J. **Diversidade genética em *Dioscorea* spp. no Recôncavo da Bahia**. Revista Brasileira de Agroecologia 4(2):515-519. 2009.

CAZÉ FILHO, J. Clonagem do Inhame (*Dioscorea* sp.) por Métodos Biotecnológicos. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA – PB., 2002. v.1, p. 113-123.

COELHO, R.S.B. Resistência genética a doenças na cultura do inhame (*Dioscorea* spp.). In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002. p. 109 – 121.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, Oxford, v.10, p.349-356, 2001.

CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1978. v. 2.

COSTA, T. **Crescimento *in vitro*, aclimatização e conteúdo de Diosgenina de diferentes somaclones de *Dioscorea compósita* Hemsl Dioscoreacea**. 2006. 145p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis. 145p. 2006.

COURSEY, D.G. Yams. An account of the nature, origins, cultivation and utilization of the useful members of Dioscoreaceae. **Tropical Agricultural Series**, London: Logmans Green, 1967. p. 78-91.

COURSEY D.G. The origins and domestication of yams in Africa. In: HARLAN, J.R.; DE WET, J.M.J.; STEMLER, A.B.L. **Origin of African plant domestication**. Mouton. The Hague, Netherlands, 1976. p. 70-74. ; p. 383-408.

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

CRIVELARO, M. Quem melhor combate a fome. Documento publicado em www.agrosoft.org.br/agropag/100080.htm criado em 28/02/2008 e impresso em 18/10/2008. AGROSOFTBRASIL, 2008. Disponível em: <http://www.faculdademodulo.com.br/Default.asp?Codigo=13669&Secao=Imprensa&SubSecao=Artigos>. Acesso em: 15 out.2009.

DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H.T. **The Monocotyledons: A Comparative Study**. London: Academic Press, 1982. p. 378.

DANSI, A.; ZOUNDJIHEKPON, J. ; MIGNOUNA, H.D.; QUIN, M. Collecte d'ignames cultivées du Complexe *Dioscorea cayenensis- rotundata* au Benin. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, v. 112, p. 81–85, 1997.

- DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; ZOUNDJIHÉKPON, J.; SANGARE, A.; AHOUSSOU, N.; ASIEDU, R. Identification of some Benin Republic's Guinea yam (*Dioscorea cayenensis/rotundata* complex) cultivars using Randomly Amplified Polymorphic DNA. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.47, p.619-625, 2000.
- DÉGRAS, L. **L'igname**. Paris:WCTA, Maisonneuve et Larose (Ed.), 1994. 133p.
- DIXIT S.; MANDAL B.B.; AHUJA S.; SRIVASTAVA P.S. Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. using RAPD, biochemical and morphological analysis. **Cryoletters**. Bedfordshire Volume 24, Number 2. pp. 77-84(8). 2003.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, p. 13-15, 1991.
- EDWARDS, A.L.; JENKINS, R.L.; DAVENPORT, L. J. Presence of diosgenin in *Dioscorea batatas* (Dioscoreaceae). **Economic Botany**, New York, v. 56, n.2, p. 204-206, 2002.
- EGESI, C.N.; ASIEDU, R.; UDE, G.; OGUNYEMI, S.; EGUNJOBI, J.K. AFLP marker diversity in water yam (*Dioscorea alata* L.) **Plant Genetic Resources: characterization and utilization**, Rome, v.4, n.3, p. 181-187, 2006.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature**, London, v.5, p. 435-445, 2004.
- ESSAD, S. Variation géographique des nombres chromosomiques de base et polyploidie dans le genre *Dioscorea*, à propos du dénombrement des espèces *transversa* Brown. **Agronomie**, Paris, v. 4, p. 611-617, 1984.

FAOSTAT DATA (2005) - Food and Agriculture Organization.

<http://faostat.fao.org/site/336/DesktopDefault.aspx?PageID=679>. Acesso em 09/03/2010.

FAOSTAT DATA (2009) - Food and Agriculture Organization. Disponível em:

<http://faostat.fao.org/site/336/DesktopDefault.aspx?PageID=453>. Acesso em: 27 jan. 2010.

FAOSTAT DATA (2010) - Food and Agriculture Organization.

<http://faostat.fao.org/site/336/DesktopDefault.aspx?PageID=336>. Acesso em 15 out. 2012.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed., Brasília: EMBRAPA/CERNAGEM EMBRAPA-Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998. 220p.

GARCIA, M.O.S. Estudo da diversidade genética e da taxa de cruzamento em *Stylosanthes* ssp. através de marcadores microsatélites. 2009. 157p. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

GOLDSTEIN D. B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites**: evolution and applications. Oxford: Oxford University Press, 1999. 368p.

GRANDO, C. **Aspectos da demografia do cajueiro-do-campo (*Anacardium humile*) em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo e construção de bibliotecas enriquecidas de microsatélite para a espécie**. 2009. 77p. Dissertação de (Mestrado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento de Plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.715-740.

GUPTA P.K.; BALYAN H.S.; SHARMA P.C.; RAMESH B. Microsatellites in plants: a newclass of molecular markers. **Current Science**, Bangalore, v. 70, p. 45–54, 1996.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, California. v.4, 9p., 2001.

HANDY, E.S.C. **The Hawaiian Planter: His Plants, Methods and Areas of Cultivation**. Honolulu: Bernice P. Bishop Museum, 1985. 227p.

HARRIS, D.R. The origins of agriculture in the tropics. **American Scientist**, New Heaven, v. 60, p.180–193, 1972.

HOCHU, I.; SANTONI, S.; BOUSALEM, M. Isolation, characterization and cross-species amplification of microsatellite DNA loci in the tropical American yam *Dioscorea trifida*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, p.137–140, 2006.

HOU, W.C.; HSU, F.L.; LEE, M.H. Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. **Planta Medica**, Stuttgart, v.68, p.1072-1076, 2002.

HU, K.; DONG, A.J.; YAO, X.S.; KOBAYASHI, H.; IWASAKI, S. A furostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var *hypoglauca*. **Phytochemistry**, New York, v.44,n.7, p. 1339-1342, 1997.

HU K.; YAO, X. Protodioscin, (NSC – 698 796): Its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in an anticancer drug screen panel. **Planta Medica**, Stuttgart. 68: 297-301. 2004.

ILE, E.I.; CRAUFURD, P.Q.; BATTEY NH, ASIEDU R. Phases of dormancy in yam tubers (*Dioscorea rotundata*). **Annals of Botany**, London, v. 97, 497–504, 2006

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYE; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used

traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 90, p.33-38, 2004.

JANZEN, D.H. **Ecologia Vegetal nos Trópicos**. São Paulo: Edusp., 1980. 79p.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: companhia editora nacional, 1998. 778p.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Dordrecht, v. 177,p. 309–334, 2011.

KALU, B.A.; ERHABOR, P.O. Production and economic evaluation of white yam (*Dioscorea rotundata*) minisetts under ridge and bed production systems in a tropical Guinea savanna location. Nigeria, **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 69, p. 78–82, 1990.

KARP, A.; EDWARDS, K. DNA markers: a global overview. In: CAETANO-ANNOLES, G.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **DNA Markers**: Protocols, Applications and Overviews, New York: Wiley-VCH.. 1997. p.1-14

KIJAS, J.M.; FOWLER, J.C.; GARBETT, C.A.; THOMAS, M.R. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin coated magnetic particles. **Biotechniques**, Natick, v. 16, p. 656-662, 1994.

KREBS, C.J. **Ecological methodology**.2nd ed. Addison Wesley:Longman, 1999.620p.

LEBOT, V.; TRILLES, B.; NOYER, J.L.; MODESTO, J. Genetic relationships between *Dioscorea alata* L. cultivars. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.45, p.499-509, 1998.

LEBOT, V.; MALAPA, R.; MOLISALE, T.; MARCHAND, J.L. Physico-chemical characterisation of yam (*Dioscorea alata* L.) tubers from Vanuatu. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, p. 1–10, 2005.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops**: cassava, sweet potato, yams and aroids. In: Lebot, V. Pests and diseases. Wallingford: CAB International, 2009. p. 253-264. (**Crop production science in horticulture series**)

MALAPA, R.; ARNAU, G.; NOYER, J.L.; LEBOT, V. Genetic diversity of the greater yam (*Dioscorea alata* L.) and relatedness to *D. nummularia* Lam. And *D. transversa* Br. as revealed with AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, cidade, v.52, p. 919-929, 2005.

MALAUURIE, B.; TROUSLOT, M.B.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J..Médium-term and long-term in vitro conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Nature Biotechnology**, London, v..1, n.3, p. 102 - 117,1998.

MENDES, R.A. **Cultivando inhame ou cará da costa**. Cruz das Almas: (EMBRAPA/CNPMPF, 1982. 16p. 2005.(Circular técnica, 4/82).)

MESQUITA, A.S. Inhame na Bahia: a produção a caminho da competitividade. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.4, n.2, p.39-48, nov.2001.

MESQUITA, A. S. INHAME - *Dioscorea cayennensis* Lam. – E TARO – *Colocasia esculenta* (L.) Schott. - Cenários dos mercados brasileiro e internacional. In: Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e taro. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB v.1, 2002. p.215-238.

MIGNOUNA H.D.; DANSI A. Yam (*Dioscorea* ssp.) domestication by the Nago and Fon ethnic groups in Benin. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.50, p. 519-528, 2003.

MIGNOUNA, H.D.; ABANG, M.M.; FAGBEMI, S.A. A comparative assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for white yam (*Dioscorea rotundata*) germplasm characterization. **Annals of Applied Biology**, London, v.142, p.269-276, 2003.

MIGNOUNA, H.D; ABANG, M.M.; ASIEDU, R. Harnessing modern biotechnology for tropical tuber crop improvement: Yam (*Dioscorea* spp.) molecular breeding. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.2, p. 478-485, 2005.

MONTALDO, A. **Cultivo de raíces y tubérculos tropicales**. São José: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas de la OEA, 1991. 408p.

MONTEIRO, D.A. Situação atual e perspectiva do inhame no estado de São Paulo. In: CARMO, C.A.S. (Ed.) **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória, ES: INCAPER, 2002. p.84-92.

MUÑOZ, Y.C.G. **Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE. 2003. p.148**. Tese (Mestrado em Educação Para El Desarrollo Y La Conservación) - Centro Agronomico Tropical De Investigacion Y Enseñanza-Catie, Costa Rica. 2003.

MIYZAWA, M.; SHIMAMURA, H.; NAKAMURA, S.; KAMEOKA, H. Antimutagenic activity of (+)- β -eudesmol and paenol from *Dioscorea japonica*. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, California, v.44,p.1647-1650, 1996.

MULLIS, K.; FALIONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.

NARULA, A.; KUMAR, S.; BANSAL, K.C.; SRIVASTAVA, P.S. In vitro micropropagation, differentiation of aerial bulbils and tubers and diosgenin content in *Dioscorea bulbifera*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.69, p.778-779, 2007.

OASHI, M.C.G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba.**1999. p. 253.Tese (Doutorado na área de) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,1999.

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

OBIDIEGWU JE; ASIEDU R; ENE-OBONG EE; MUONEKE CO; KOLESNIKOVA-ALLEN M. Genetic characterization of some water yam (*Dioscorea alata* L.) in West Africa with simple sequence repeats. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsink, v.7, p.3-4, 2009.

OLASANTAN, F.O. Effect of time of mulching on soil temperature and moisture regime and emergence, growth and yield of white yam in western Nigeria. **Soil Tillage Research**, v.50, p. 215–221, 1999.

OLUFOWOTE J.O.;Y. XU, X. CHEN, W.D. PARK, H.M. ;BEACHELL,R.H.; DILDAY, M.;GOTO ,S.R.;MCCOUCH. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLPmarkers. **Genome**, Ottawa, v.40, p.370-378, 1997.

ONWUEME, I.C.;CHARLES, W.B. **Tropical root and tuber crops. Production, perspectives and future prospects.** FAO:Rome, 1994.p. 228 (FAO Plant Production and Protection Paper, 126).

OPARA, L.U. **Edible aroids:** post-harvest operation. New Zealand: FAO. 1999. 38 p.

ORKWOR G.C. The importance of yams. In: Orkwor G.C.; Asiedu, R.; Ekanayake, I.J. (Ed.).**Food Yams, Advances in Research IITA and NRCRI**, Nigeria, p.1-12, 1998.

OZEROL, N.H.; MASSEY, H.F. Speculation in the understanding of production the root tropical potato, yam and cocoyams. **Root Crop**, Australia, v.. 14, p.1-23, 1984.

PEDRALLI, G. Collecting wild relatives of yam (*Dioscorea spp.*) in the Espinhaço range, Brazil. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, n.97, p.51,1994.

PEDRALLI, G. Distribuição geográfica e taxonomia das famílias Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. In: CARMO, C.A.S. (Ed.) **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória, ES: INCAPER, 2002. p.15-26.

PEDRALLI, G. **Dioscoreáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2004. 83p.(Flora Ilustrada Catarinense).

PENHA, H.A. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites em *Passiflora alata* Curtis**. 2007. 93p. Tese (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

PÉPIN, L.Y.; AMIGUES, A; LÉPINGLE, J.-L.; BERTHIER, A.; BENSALD D. VAIMAN. Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. **Heredity**, Edimburgh,v.74, p. 53-61, 1995.

PIPERNO, D.R.; RANERE A.J; HOLST I.; HANSELL P. Starch grains reveal early root crop horticulture in the Panamanian tropical forest. **Nature**, London, v.407, p. 894 – 897,2000.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops monocotyledons**. New York: J. Wiley,1972. . 607p.

RAFALSKI, J.A.;VOGEL, J.M.;MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C. ;TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E.(Ed.). **Nonmammalian Genome Analysis. A Practical Guide**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 75-134.

RAMSER, J.; LÓPEZ-PERALTA, C.; WETZEL, R.; WEISING, K.; KAHL, G.
Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, Ottawa, v.39,p. 17-25,1996.

RIZZINI, C. T.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2 ed. Revisada e Atualizada. Rio de Janeiro: ÂMBITO CULTURAL. 1995. 248p.

RITZINGER, C.H.S.P.; SANTOS-FILHO, H.P.; ABREU, K.C.L.M.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. **Aspectos fitossanitários da cultura de inhame**. Embrapa. 2003. 39p.

ROMERO, G.; ADEVA, C.; BATTAD II, Z. Genetic fingerprinting: advancing the frontiers of crop biology research. **Philippine Science Letter**, Filipinas, v. 2,p. 8-13,2009.

SANTOS, E.S. Esclarecimentos sobre as denominações dos gêneros *Dioscorea* e *Colocasia*. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa:EMEBA, 2002. p.303-305.

SANTOS, E.S.; MACEDO, L.S. **Tendências e potencialidades da cultura do inhame (*dioscorea sp.*) no nordeste do Brasil**. 2006. João Pessoa. Disponível em: http://www.emepa.org.br/inhame_tendencias.php. Acesso em: 12 nov. 2011.

SARTIE, A; FRANCO, J; ASIEDU, R. Phenotypic analysis of tuber yield- and maturity-related traits in white yam (*Dioscorea rotundata*).**African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.11,n.17, p. 3964-3975, 2012.

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

SCARCELLI, N.; TOSTAIN, S.; MARIAC, C.; AGBANGLA, C.; DA O.; BERTHAUD, J.; PHAM J.L. Genetic nature of yams (*Dioscorea* sp.) domesticated by farmers in Benin (West Africa). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.53, p. 121-130.2006.

SEAGRI. **Cultura do cará**. 2002.Disponível em:

<http://www.seagri.ba.gov.br/cara.htm>. Acesso em: 28 nov.2010.

SEGARRA-MORAGUES, J.G.; PALOP-ESTEBAN, M.; GONZA'LEZ-CANDELAS, F.; CATALA'N, P. Characterization of seven (CTT)_n microsatellite loci in the Pyrenean Endemic *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae): remarks on ploidy level and hybrid origin assessed through allozymes and microsatellite analyses. **Journal of Heredity**, Washington, v. 95, p.177–183, 2008. 2004.

SCHLOTTERER C.; HARR B. *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, p.1641-1646, 2000.

SCHLÖTTERER C.; RITTER R.; HARR B.; BREM G. High mutation rates of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele specific mutation rates. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.15, p.1269–1274, 1998.

SHARMA, K; KUMAN, A; MISRA, R.S.A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops.**African Journal of Biotechnology**, Nairobi,v. 7, n.8, p. 1018–1022, 2009.

SIA, E.A.; BUTLER C.A.; DOMINSKA, M.; GREENWELL, P.; FOX, T.D.; PETES T.D. .Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*.**Proceedings of the National Academy of Sciences, London**, v. 97, p.250-255, 2000.

SILVA, L.R.G. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização genética de etnovariedades de inhame do complexo *Dioscorea cayenensis* – D.**

rotundata. 2011. 79p. Tese (Doutorado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SIQUEIRA, M.V.B.M. **Caracterização da diversidade genética de inhame (*Dioscorea alata*) utilizando marcadores microssatélites**. 2011. 153p.

Tese(Doutorado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SIQUEIRA, M.V.B.M. ; MARCONI, T.G. ; BONATELLI, M.L. ; ZUCCHI, M. I. ; VEASEY, E.A. New microsatellite loci for water yam (*Dioscorea alata*, Dioscoreaceae) and cross-amplification for other *Dioscorea* species. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 98, p. e144-e146, 2011.

SOSINSKI, B.; GANNAVARAPU, M.; HAGER, L.D.; BECK, E.; KING, G.J.; RYDER, C.D.; RAJAPAKSE, S.; BAIRD, W.V.; BALLARD, R.E.; ABBOTT, A.G. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, no. 3, p. 421-428. 2000.

SOUGATA, G.; MEHUL, A.; SUMERSING, P. Antidiabetic Activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*: Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors, **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v.2012, Article ID 929051, p.10 2012. doi:10.1155/2012/929051

TAMIRU, M; BECKER, H.C.; MAASS, B.L.Genetic Diversity in Yam Germplasm from Ethiopia and their Relatedness to the Main Cultivated *Dioscorea* species Assessed by AFLP Markers.**Crop Science**, Madison, v.47, p.1744 – 1753, 2007.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.27, p.205-233, 1993.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.17, p. 6463–6471, 1989.

TERAUCHI, R.; KONUMA, A. Microsatellite polymorphism in *Dioscorea tokoro*, a wild yam species. **Genome**, Ottawa, v.37, p.794–801,1994.

TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSIQUOT, J.M.;CHARRIER; A.
Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 1, p. 171-177, 1990.

TOSTAIN, S.; SCARCELLI, N.; BROTTIER, P.; MARCHAND, J.L.; PHAM, J.L.; NOYER, J.L. Development of DNA microsatellite markers in tropical yam (*Dioscorea* sp.). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, p.173-175, 2006.

VAN OOSTEROM, E.J.; CECCARELLI, S. Indirect selection for grain yield of barley in harsh mediterranean environments. **Crop Science**, Madison, v. 33, p. 1127-1131, 1993.

VANDERGAST, A.G.; BOHONAK A.J.; WEISSMAN D.B.; FISHER R.N.
Understanding the genetic effects of recent habitat fragmentation in the context of evolutionary history: phylogeography and landscape genetics of a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmatidae: Stenopelmatus). **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, p.977–992, 2007.

VEASEY, E.A.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; GOMES, L.R.; NASCIMENTO, W.F.; FERREIRA, A.B.; SILVA, D.M.; SILVA, E.F.; MING, L.C.; PERONI, N.; SANTOS, A.H. Ocorrência e diversidade de espécies cultivadas do gênero *Dioscorea* em diversos agroecossistemas brasileiros. In: KFFURI, C.W.; AMOROZO, M.C.; MING, L.C. (Org.). **Agrobiodiversidade no Brasil: experiências e caminhos da pesquisa**. NUPEEA, Recife, v 1, p.45–74, 2010.

VERNIER, P.; ORKWOR, G.C.; DOSSOU, A.R.Studies on yam domestication and farmers' practices in Benin and Nigeria. **Outlook on Agriculture**, London.v.32,p.35–41, 2003.

VERSPOHL, E.J. Recommended testing in diabetes research. **Planta Medica**, Stuttgart, v.68, p. 581 – 590, 2002.

VIANA, A.M. **Crescimento e Reprodução de *Dioscorea composita***. 1985. 212 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n×(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, San Diego, v. 7, p. 524-530, 1990.

WEBERLING, F.; SCHWANTES, H.O. **Taxonomia vegetal**. São Paulo EPU, 1986. p.165.

WILSON, J.E. A practical guide to identifying yams: the main species of *Dioscorea* in the Pacific Island. Western Samoa Hawaii: **Ireta Publications**, 1998. 7p.

YAMAMOTO, M.M.; KAWANO, T.; YOUNG, M.C.M.; CHU, E.P.; HARAGUCHI, M.; HIROKI, K. Molluscicidal activity of three Brazilian plants species. **Fitoterapia**, Milano, v.67, n.1, p. 59-62, 1996.

YEH, F.; YANG, R.C.; MAO, J.; YE, Z.; BOYLE, T.J.B. **The user-friendly shareware for Population Genetic Analysis**. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, 1997.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.1–16, 2002.

ZOUNDJIHEKPON, J.; HAMON, P.; NOIROT, M.; TIO-TOURÉ, B.; HAMON, S. Flowering synchronization between male and female West African cultivated yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata* complex). **Euphytica**, Dordrecht, v.95, p.371-375, 1997.

ANEXOS

=====| **CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA ENRIQUECIDA EM
MICROSSATÉLITES** |===== **PROTOCOLO CBMEG-UNICAMP**

1 DIGESTÃO

Objetivo: *Digerir o DNA genômico para gerar fragmentos de tamanhos adequados.*

Reação (Tubo de 1,5 µL):

Água MilliQ	50 µl
Tampão	10 µl
Espermidina (40 mM)	10 µl
Enzima <i>Afa I</i> - Antiga <i>Rsa I</i> (10u/µL)	5 µl
DNA em uma concentração de 250ng/µL (=5 µg)	25 µl
Total:	100 µL

Incubar por 3h a 37°C (estufa). Para obter um melhor resultado, colocar metade do volume da enzima 2,5 µl, incubar por 1h, colocar a outra metade de enzima e incubar por mais 2h.

Controle:

Aplicar 10 µl da digestão + 2 µl stop em um gel de agarose 1% TAE 1X (70V). Corar em brometo de etídeo por 20 min. Deve ser observado um *smear* (arraste) uniforme entre 700 e 1200pb.

2 LIGAÇÃO DE ADAPTADORES

Objetivo: *Garantir que todos os fragmentos digeridos tenham uma terminação comum e conhecida.*

Rsa21 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3'

Rsa25 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'

Reação (Tubo de 0,6 µL):

Água MilliQ	12 µl
Tampão 5X (Invitrogen)	5 µl
Rsa21 (10 µM)	1,5 µl
Rsa25 (10 µM)	1,5 µl

T4 DNA ligase (Invitrogen) (1u/ μ L)	2 μ l
DNA digerido	3 μ l
Total:	25 μ L

Incubar por 2h a 20°C (termociclador)

3 PRÉ-AMPLIFICAÇÃO VIA PCR

Objetivo: *Amplificar a quantidade de fragmentos e garantir que a ligação tenha ocorrido.*

Reação (Tubo de 0,6 μ L):

Água MilliQ	26 μ l
Tampão 10X	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
dNTP (2,5 mM)	4 μ l
Rsa21 (10 μ M)	2 μ l
Taq DNA polimerase (= 3U, Caseira)	5 μ l
Ligação	5 μ l
Total:	50 μ L

Ciclos: 95°C 4min, seguido de 20 ciclos (94°C 30s, 60°C 1 min, 72°C 1 min) e 72°C por 8 min.

Controle:

Aplicar 10 μ l da amplificação + 2 μ l stop em um gel de agarose 1% TAE 1x (110V). Corar em brometo de etídeo por 20 min. Deve-se observar um smear de 300 a 1200pb.

OBS.: Com o aumento do número de ciclos, há o aumento da redundância.

4 PURIFICAÇÃO

Objetivo: *Preparar o DNA para a etapa de seleção de fragmentos de interesse.*

Purificar o restante da amplificação (aproximadamente 40 μ l) usando o kit “Quiaquick PCR purification kit” (QIAGEN Cat. # 28106). Todas as centrifugações deverão ser realizadas a 12000-13000 rpm.

1. Adicione 5 volumes de tampão PB a 1 volume de amostra de PCR e misture. Se a mistura estiver laranja ou violeta, adicione 10 μ l de acetato de sódio 3M, pH 5.0 e misture. A mistura vai se tornar amarela.

Volume de PCR (40 μ l). Volume de tampão PB (200 μ l).

2. Coloque a coluna no tubo coletor de 2mL.

3. Para ligar o DNA, aplique a amostra na coluna e centrifugue por 1 min em rotação máxima.

4. Descarte a solução do tubo coletor. Coloque a coluna no mesmo tubo coletor.

5. Para lavar, adicione 700 µl de tampão PE à coluna e centrifugue por 1 min em rotação máxima.
6. Descarte a solução do tubo coletor. Coloque a coluna no mesmo tubo coletor. Centrifugue por mais 1 min em rotação máxima para garantir que todo o etanol seja descartado.
7. Coloque a coluna em um tubo novo de 1,5 mL.
8. Para eluir o DNA, adicionar à coluna 50 µl de água milliQ no centro da membrana e centrifugue por mais 1 min em rotação máxima.
9. Repetir o passo anterior para garantir a completa eluição do DNA ligado à coluna.

5 SELEÇÃO DE FRAGMENTOS CONTENDO MICROSSATÉLITES

Objetivo: *Selecionar os fragmentos que contêm microssatélites.*

Não esquecer de ligar o banho previamente e deixa-lo a 95°

1º: Preparo das beads:

1. Ressuspender os 600µl de “bolinhas magnéticas” por agitação.
2. Magnetizar, esperar 30s e, com cuidado, aspirar o sobrenadante.
3. Adicionar 300 µl de SSC 0,5X, ressuspender, magnetizar, e descartar o sobrenadante.
4. Repetir a etapa anterior 3 vezes.
5. Ressuspender em 100 µl de SSC 0,5X (com a p200).

2º: Preparo do DNA purificado:

1. Juntar 400 µl de água MilliQ aos 100 µl de DNA purificado.
2. Incubar a 95°C no banho por 15 min.
3. Adicionar 13 µl de SSC 20X e depois 3 µl de cada oligo de microssatélite biotinolado (50 µM) Biotina - IIII(CT)8 e Biotina - IIII(GT)8.
4. Deixar à temperatura ambiente por 20 min, agitando lentamente a cada 2 min (nota: a agitação é muito importante nesta fase!).
5. Misturar os 100 µl de bolinhas pré-lavadas com os 519 µl (400 µl H₂O + 100 µl DNA + 3 µl oligo (CT) + 3 µl oligo (GT) + 13 µl SSC 20X) de mistura de hibridização.
6. Incubar por 10 min à temperatura ambiente agitando suavemente o tempo todo. (Apenas rolar os tubinhos entre os dedos – NÃO AGITAR).
7. Magnetizar por 30s e aspirar o sobrenadante.
8. Ressuspender em 300 µl de SSC 0,1X (nota: sempre trocar a ponteira para não contaminar o SSC).

9. Repetir as duas etapas anteriores 3 vezes.
10. Ressuspender em 100 µl de água, magnetizar e esperar por 30s.
11. Reservar o sobrenadante em um eppendorf e ressuspender mais uma vez com 150 µl de água.
12. Magnetizar novamente e retirar o sobrenadante (150 µl). Juntar as duas partes (250 µl). Conservar a -20°C.

6 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS SELECIONADOS

Objetivo: Amplificar os fragmentos digeridos (previamente ligados a adaptadores) para gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade.

Reação (Tubo de 0,6 µL):

Água MilliQ	51,5 µl
Tampão de PCR 10X	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
dNTP (2,5 mM)	8 µl
Rsa21 (10 µM)	4 µl
Taq DNA polymerase (comercial)	0,5 µl
Fragmentos selecionados	20 µl

Total: 100 µl

Ciclo: 95°C 1 min, seguido de 25 ciclos (94°C 40s, 60°C 1 min, 72°C 2 min) e 72°C por 5 min.

Controle:

Aplicar 10 µl da reação de amplificação + 2 µl stop em um gel de agarose 1% TAE 1x (70V). Corar em brometo de etídeo por 20 min. É esperado um *smear* entre 200 e 1200pb; não deve haver bandas preferenciais.

7 CLONAGEM EM UM VETOR pGEM-T

Objetivo: Ligar os fragmentos amplificados via PCR a um vetor de clonagem.

Reação (Tubo de 0,6 µL):

Água MilliQ	9,5 µl
Tampão 5X (Invitrogen)	4 µl
Plasmídeo	1 µl
Produto de amplificação	6 µl
Ligase (Invitrogen)	1,5 µl
Total:	22 µl

Incubar overnight a 4°C (termociclador ou geladeira).

5.B. pGEM®-T Vector Map and Sequence Reference Points

pGEM®-T Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161-177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185-201
β -lactamase coding region	1322-2182
phage f1 region	2365-2820
<i>lac</i> operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941-2957
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3

8 ELETROPORAÇÃO EM XL1-BLUE

Objetivo: Transformar células de *E. coli* com o produto de clonagem para proporcionar a amplificação do inserto.

Protocolo para Eletroporador Bio-Rad *E. coli* Pulser para cuvetas de 0,2 cm.

1. Envolve a cuveta de eletroporação em papel alumínio e incube em gelo por pelo menos 10 minutos.
2. Retire as eletrocompetentes. Freezer -80 e incube em gelo.
3. Ajuste a voltagem do equipamento para 2,5KV (2.500V) apertando os botões LOWER e RAISE juntos (2x).
4. Adicione de 1 a 2 μ L da reação de ligação na célula.
5. Retire a cuveta do gelo e tire o papel alumínio que a envolve.
6. Recolha célula + ligação e coloque a mistura dentro da cuveta (com CUIDADO).

7. Certifique-se que as células atingiram o fundo da cuveta, caso seja necessária, bata a cuveta (DELICADAMENTE) na bancada para que a mistura atinja o fundo.
 8. Coloque a cuveta contendo a mistura (célula + ligação) na câmara de choque.
 9. Para eletroporar aperte os dois botões indicados como PULSE até que escute o sinal sonoro.
 10. Retire **rapidamente** a cuveta do aparelho e adicione 950 µL de meio SOC (ou LB líquido).
 11. Misture com a pipeta até que o líquido se torne homogêneo.
 12. Pressione os botões SET VOLTS e ACTUAL VOLTS ao mesmo tempo para verificar o tempo de corrente. O tempo ideal de corrente é entre 4,8 e 5,2 millissigundos.
 13. Incube as células por 1h a 37°C.
 14. Ressuspender as células com uma ponteira e plaquear 30 µl, 60 µl e 120 µl por placa contendo Meio LB + ampicilina (preparada a 100 mg/ml). A cada uma das placas, adicionar 30 µl de IPTG + 30 µl de X-Gal, totalizando **três placas por biblioteca**. Colocar um volume de cada (bactéria, IPTG e X-Gal) em uma porção oposta da placa.
 15. Espalhar com uma alça de Drigalsky até secar e incubar overnight (16h a 20h) a 37°C.
 16. Coloque em geladeira por 1-2h para que as colônias fiquem azuis.
- Obs:** se houver um estouro durante o pulso do choque, a transformação estará comprometida, isso geralmente ocorre devido à presença de concentrações altas de sais na reação de ligação. Esse problema pode ser resolvido com a purificação da reação de ligação.

9 MANUTENÇÃO DOS CLONES

Objetivo: *Garantir que cada construção (vetor + fragmento) seja mantida em condições apropriadas para análise posterior.*

1. Utilizar placas ELISA com fundo em U, contendo 200 µl de meio 2YT-HMFM + ampicilina (100 µg/ml) por poço. As colônias **brancas** devem ser repicadas com a ajuda de palitos estéreis.
2. Os dois últimos poços H11 e H12 devem conter **uma colônia AZUL e um palito sem colônia**, respectivamente. Estes vão servir como controle da placa e deverão ser discriminados na etiqueta do banco.
3. Deixar crescer overnight (16h a 20h) a 37°C.
4. Deixar em freezer -20°C por 30 min e então, armazenar em freezer -80°C.

As placas ELISA com fundo em U devem conter em sua tampa a seguinte etiqueta:

10 AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS CLONADOS

Objetivo: *Verificar se os clones transformados contêm insertos.*

1. Dentro do fluxo laminar, retirar as placas com os clones a serem amplificados deixando-as descongelar em gelo.
2. Preparar o mix da reação de PCR e aliquotar nas microplacas
4. Colocar 2 µl do material estocado e saído do freezer, o qual deve estar descongelado para não se pegar gelo ou *debri* (resto) celular.

Reação de PCR:

Água MilliQ	13,25 µl
Tampão 10X	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
Rsa21 (10 µM)	1,25 µl
Taq DNA polimerase	2,0 µl
DNA clone	2,0 µl
Total: 25 µl	

Ciclos: 95°C 4 min, 30 ciclos (94°C 30s, 52°C 45s, 72°C 1 min e 30s) e 72°C por 8 min.

Controle:

Aplicar 18 µl da amplificação + 3 µl stop em um gel de agarose 1,5% TAE 1X (100V por 1h e 30 min). Corar em brometo de etídeo por 20 min. Deve-se observar 2/3 bandas de diferentes tamanhos.

11 INOCULAÇÃO E EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

Objetivo: *Isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes para posterior sequenciamento.*

* Adicionar 1µl/ml de ampicilina (100 mg/ml) no meio Circle Grow. Para cada 100 ml de meio, adicionar 100µl.

1. Colocar 1 ml de meio Circle Grow contendo ampicilina em cada pocinho da placa deep well;
2. Inocular 2 µl dos clones individuais com o auxílio de pipeta multicanal. Selar a placa com adesivo;
3. Incubar a 37°C (shaker), 300 rpm, **durante 22h**;
4. Centrifugar por 6 min, 3000 rpm, para sedimentar as células (20°C);
5. Descartar o sobrenadante e manter a placa invertida sobre papel absorvente por 1 min;
6. Adicionar a cada pocinho 240 µl de GTE, selar a placa com adesivo e ressuspender as células agitando no vortex por 2 min;
7. Centrifugar por 6 min a 4000 rpm (20°C);
8. Descartar o sobrenadante com cuidado;

9. Adicionar a cada pocinho 60 µl de GTE + 2,5 µl de RNase 10 mg/ml, selar a placa com adesivo comum e agitar no vortex por 5 min. (medir e misturar RNase +GTE em proveta);
10. Adicionar a cada pocinho 60 µl de NaOH 0,2M – SDS 1% , selar a placa com adesivo e misturar 10x por inversão. Incubar 10 min à temperatura ambiente (nota: começar a marcar o tempo quando colocar a solução na primeira fileira);
11. Colocar na centrífuga e dar um spin (até 1000 rpm);
12. Adicionar a cada pocinho 60 µl de KOAc 3M (estocado a 4°C), selar a placa com adesivo e misturar 10x por inversão;
13. Colocar na centrífuga e dar um spin (até 1000 rpm);
14. Não remover o adesivo e incubar em estufa a 90°C por exatos 30 min;
15. Esfriar a placa em gelo por 10 min e centrifugar por 10 min a 4000 rpm, 4°C;
16. Fixar com fita adesiva uma placa filtro no topo de uma placa de fundo em V, atentando para o alinhamento dos pocinhos;
17. Transferir todo o volume para a placa filtro e centrifugar por 4 min a 4000 rpm, 20°C. Não coletar a “nata”, se necessário, empurre com a pipeta;
18. Remover a placa filtro e adicionar ao filtrado 90 µl de isopropanol;
19. Selar a placa com adesivo e misturar 20x por inversão;
20. Centrifugar por 45 min a 4000 rpm, 4°C;
21. Descartar cuidadosamente o sobrenadante e adicionar 160 µl de etanol 70% gelado;
22. Centrifugar por 10 min a 4000 rpm, 4°C, e descartar o sobrenadante;
23. Inverter a placa sobre papel absorvente, colocá-la invertida na centrífuga e dar um spin até 300 rpm (**aceleração e desaceleração** baixas).
24. Deixar secar por 60 min à temperatura ambiente (ao abrigo da luz);
25. Ressuspender em 30 µl de água MilliQ (overnight).

Controle:

Aplicar 3 µl plasmídeo + 3 µl água + 5 µl stop em um gel de agarose 1 % TAE 1x. Corar em brometo de etídeo por 20 min. Deve-se observar de 2 a 4 bandas de tamanhos variados entre as amostras. Da banda mais baixa para a mais alta: *coil*, linearizada, *supercoil* e dímero.

12 PREPARO DAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Objetivo: *Amplificar o inserto em condições nas quais o fragmento possa ser sequenciado automaticamente.*

Preparar ao abrigo da luz:

Água MilliQ	1 µl
Tampão Save Money	2 µl
Primer (5 pmol/µl)	1 µl
DNA plasmídeo	4 µl
Big Dye (vs.3.1)*	2 µl
Total: 10 µl	

Ciclos: 96°C por 2 min, seguido de 35 ciclos (96°C 45s, 50°C 30s, 60°C 4 min).

(Nota: A versão do Big Dye está associada ao tipo de matriz usada no sequenciamento)

13 PURIFICAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Objetivo: *Eliminar possíveis interferentes ou excessos de reagentes da reação de sequenciamento e deixar as amostras prontas para a eletroforese.*

1. Adicionar 80 µl de isopropanol a 65% (Big Dye vs. 3) ou isopropanol 75% (Big Dye vs. 2) a cada pocinho;
2. Deixar em repouso durante 15 min à temperatura ambiente (ao abrigo da luz);
3. Centrifugar por 45 min a 4000 rpm, 10°C;
4. Descartar o sobrenadante no papel toalha, cuidadosamente;
5. Adicionar 100 µl de etanol 70% gelado;
6. Centrifugar por 10 min a 4000 rpm, 10°C;
7. Descartar cuidadosamente o sobrenadante em papel toalha;
8. Dar um spin até 200 rpm, com a placa invertida em papel toalha (aceleração e desaceleração mínimas);
9. Secar a placa por uma hora em lugar arejado e ao abrigo da luz;
10. Ressuspender o DNA em 4 µl de tampão de corrida (Blue Dextran + formamida), misturar e desnaturar por 3 min a 95°C