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

**Caracterização da diversidade genética de inhame (*Dioscorea alata*) utilizando
marcadores microssatélites**

Marcos Vinícius Bohrer Monteiro Siqueira

**Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor em Ecologia Aplicada**

**Piracicaba
2011**

Marcos Vinícius Bohrer Monteiro Siqueira
Engenheiro Biotecnólogo

**Caracterização da diversidade de inhame (*Dioscorea alata*)
utilizando marcadores microssatélites**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

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

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Ecologia Aplicada

**Piracicaba
2011**

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

Siqueira, Marcos Vinícius Bohrer Monteiro

Caracterização da diversidade genética de inhame (*Dioscorea alata*) utilizando marcadores microssatélites / Marcos Vinícius Bohrer Monteiro Siqueira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011. 165 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2011.

1. Agricultura 2. Ecossistemas agrícolas 3. Inhame 4. Marcador Molecular
5. Variação genética 6. Variedades vegetais I. Título

CDD 635.23
S618c

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

"Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças."
Charles Darwin

Dedico este trabalho

A todos os que acreditam que a pesquisa pode fazer a diferença

Ofereço este trabalho

A Isabel Acero, pessoa iluminada que cruzou meu caminho e deixa saudades
(*in memorium*)

AGRADECIMENTOS

- Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido (Processo n.º 2007/07222-8).
- CAPES pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de doutorado nos primeiros meses do curso.
- A minha orientadora, Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey pelos oito anos de formação acadêmica. Foram muitos os momentos, muitos ensinamentos, no entanto sua simplicidade, generosidade e amizade fizeram de mim o que sou. Graças a sua orientação desde minha graduação, passando pelo mestrado e concluindo-se no doutorado consegui atingir muitas metas impensáveis. Sou-lhe eternamente grato!
- Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira pelas excelentes aulas e conselhos em prol da minha pesquisa e pelas muitas sugestões ao trabalho.
- Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi pelas várias sugestões e colaborações ao longo do projeto, tanto na produção dos artigos como pelo apoio durante todo o período deste trabalho.
- Profa. Dra. Maria Christina M. Amorozo pelas muitas contribuições ao trabalho, sobretudo nas informações etnobotânicas.
- Profa. Dra. Silvia Molina por compartilhar seus conhecimentos através de suas aulas, por ter permitido olhar a ciência de outra forma e pelas contribuições a tese.
- Prof. Dr. Paulo César Tavares de Melo por acreditar no meu trabalho, disponibilizando obras, informações e permitindo minha participação em importantes eventos científicos. Suas sugestões e correções neste trabalho foram imprescindíveis. E nossas conversas memoráveis.
- Dra. Teresa Losada Valle e ao Dr. José Feltran pelos materiais disponibilizados neste projeto e pela simpatia com que sempre me receberam no Instituto Agrônômico, em Campinas.
- Prof. Dr. Ling Chau Ming pelos materiais cedidos ao banco de germoplasma de inhame da ESALQ - muitos destes foram incluídos no presente trabalho.
- Prof. Dr. Nivaldo Peroni e a Profa. Dra. Natália Hanazaki pelos ensinamentos e colaboração nas coletas em Ubatuba, São Paulo.

- Aos colegas de laboratório de Ecologia Evolutiva e Genética Aplicada (LEEGA): Aline, Wellington, Danielle, Thiago, Nancy, Santiago, Caroline, Oswaldo, Carol, Berenice, bem como outros que passaram por lá como os estagiários Gabriel, Letícia e Mike que me ajudaram diariamente em toda a parte laboratorial da tese – sem vocês a missão teria sido bem mais difícil!
- Ronaldo Rabello pela colaboração em várias atividades, entre as quais coletas e manutenção do material em casa-de-vegetação e campo.
- MSc António Henrique dos Santos da EPAGRI pela grande colaboração nas coletas em Itajaí, Santa Catarina.
- Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva e Lidinalva Gomes, pela colaboração nas coletas no Nordeste e Almecina Ferreira pelas coletas em Mato Grosso.
- Andréia Moreno e Elza Ferraz do LERF pelos ensinamentos e pela parceria em alguns momentos deste projeto.
- Mara Casarin, secretária do Programa PPGI-EA pela sua eficiência, colaboração e simpatia em todos os momentos do meu doutorado.
- Tatiana Miranda pela amizade e ajuda nas coletas na região de Minas Gerais bem como por todas as contribuições na parte de etnobotânica.
- Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, Thiago Marconi, Monica Conte e Danilo Augusto do CBMEG/UNICAMP pela oportunidade de participar no curso de microssatélites em 2008 e pela ajuda na construção da biblioteca de SSR para inhame.
- Agradeço profundamente a todos os agricultores que contribuíram direta e indiretamente para a realização desta pesquisa que prontamente responderam ao questionário e contribuíram de forma decisiva para a elaboração deste trabalho.
- Ao grupo *Crop Biodiversity and Breeding Informatics* da Universidade de Hohenheim (Stuttgart, Alemanha). Agradeço ao Prof. Dr. Karl Schmid pela oportunidade e supervisão no sandwich e aos alunos Inka Gawenda e Torsten Günther pela análise estatística e colaboração na redação do último artigo desta tese. Meu agradecimento à secretária Bärbel Hessenauer por todo o apoio logístico e aos técnicos Thomas Brückner e Elisabeth Kokai-Kota. Minha gratidão também ao colega de sala Christian Lampei pelas inúmeras contribuições a este trabalho e aos vários colegas do grupo: Thomas, Oliver, Sen e Sariel pelas importantes discussões no Journal Club.

- Dr. Andrea Fadani, Diretor Executivo da Foundation Fiat Panis que possibilitou minha permanência em Stuttgart durante meu sandwich.
- Rogério Falleiros Carvalho obrigado por mais essa vitória! Obrigado igualmente pela partilha de idéias ao longo desses anos, pelos muitos conselhos, e naturalmente por essa amizade de irmão.
- Alejandro Coca pela amizade e colaboração na construção dos mapas deste trabalho.
- Juliana de Paula-Sousa pelas risadas, colaborações e muitas dicas neste percurso.
- Minha grande amiga Ana Carolina Landuyt que através das longas horas de discussões científicas, permitiu-me entender melhor o meu trabalho.
- Cristiane Acero Rodrigues Caraça pelo seu amor, companhia e sobretudo paciência; e a sua família, que me recebeu e acarinhou de forma incondicional nesta longa jornada, tornando muitos dias em momentos únicos.
- Minha família, base do que sou – mesmo distantes merecem o agradecimento pela fé que depositaram em mim. Mãe e Tia Lilinha obrigado pelos incentivos ao longo desses anos e por rezarem para que atingisse minhas metas. Aos que sempre estiveram próximos, mas me viram distantes em função da entrega a este trabalho, desculpem a minha ausência - vocês nunca saíram do meu coração.
- Aos que aqui não foram mencionados, por lapso ou esquecimento, mas que fazem jus sua presença, meu eterno e muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 A agricultura tradicional e a importância dos agroecossistemas	25
2.2 A importância das culturas negligenciadas no panorama alimentar nacional e mundial	29
2.3 Classificação botânica e taxonômica de <i>Dioscorea</i> spp	33
2.4 Origem e domesticação de <i>Dioscorea</i> spp	38
2.5 Importância econômica de <i>Dioscorea</i> spp.	40
2.6 Marcadores microssatélites	43
2.7 Caracterização da diversidade genética por meio de marcadores moleculares em <i>Dioscorea alata</i>	46
Referências	48
3 OBJETIVOS E HIPÓTESES	65
3.1 Objetivos gerais	65
3.2 Objetivos específicos	65
3.3 Hipóteses	65
4 DIVERSIDADE SÓCIOAMBIENTAL DE AGRICULTORES QUE CULTIVAM INHAME (<i>DIOSCOREA ALATA</i> L.) EM AGROECOSSISTEMAS BRASILEIROS	67
Resumo	67
Abstract (adaptar o abstract)	67
4.1 Introdução	68
4.2 Material e métodos	69
4.3 Resultados e discussão	74
4.3.1 Caracterização sócio-econômica de agricultores que plantam <i>Dioscorea alata</i>	74
4.3.2 Caracterização das áreas de cultivo e uso de nomes populares para <i>Dioscorea alata</i> .	79
4.4 Conclusões	88
Referências	89
5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>DIOSCOREA ALATA</i> L. E TRANSFERIBILIDADE PARA OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO	95
Resumo	95
Abstract	95
5.1 Introdução	96
5.2 Material e métodos	97
5.2.1 Genotipagem dos acessos utilizando os locos de microssatélites desenvolvidos para <i>D. alata</i>	98
5.2.1.1. Material utilizado	98
5.2.1.2 Extração de DNA	98
5.2.1.3 Testes de temperatura	100
5.2.1.4 Testes de concentração de magnésio	100
5.2.1.5 Eletroforese	101
5.2.1.6 Testes de transferibilidade	102

5.2.1.7 Análise dos dados.....	103
5.3 Resultados e discussão	103
5.4 Conclusões	106
Referências	106
6 DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE INHAME (<i>DIOSCOREA ALATA</i> L.)	
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES	111
Resumo.....	111
Abstract	111
6.1 Introdução	112
6.2 Material e métodos.....	114
6.2.1 Coletas e análises morfológicas	114
6.2.2 Extração de DNA	119
6.2.3 Amplificação por PCR	119
6.2.4 Análise estatística.....	122
6.3 Resultados	125
6.3.1 Dados morfológicos	125
6.3.2 Dados genéticos	125
6.4 Discussão	132
6.4.1 Caracterização morfológica	132
6.4.2 Diversidade genética	133
6.4.3 Estrutura genética.....	136
6.5 Conclusões	138
Referências	139
ANEXOS	145

RESUMO

Caracterização da diversidade de inhame (*Dioscorea alata* L.) utilizando marcadores microssatélites

O gênero *Dioscorea* é o mais amplo da família Dioscoreaceae, apresentando cerca de 600 espécies distribuídas, sobretudo, nos trópicos, com grande importância na alimentação, principalmente na África Ocidental, na Sudeste Asiático, no Caribe e em alguns países da América do Sul. No Brasil, algumas espécies de inhame (*Dioscorea* spp.), juntamente com a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), têm uma profunda importância na agricultura de subsistência, sendo utilizadas basicamente como fonte de carboidrato para alimentação humana. Pouco se conhece sobre a diversidade e estrutura genética dessas espécies, como evoluíram nos últimos anos, sobretudo pela escassez de avaliações moleculares. O presente estudo tem como objetivos: (i) apresentar dados sócio-econômicos e etnobotânicos relativos aos diferentes agricultores que cultivam a espécie; (ii) isolar primers de microssatélites usando uma biblioteca genômica enriquecida e testar sua amplificação entre outras espécies de *Dioscorea*; (iii) analisar a relação genética entre 73 variedades locais e 17 acessos comerciais de inhame coletados em cinco diferentes regiões do Brasil (Sul, Sudeste, Nordeste, Norte e Centro-oeste) usando um conjunto de 12 microssatélites. Túberas de inhame foram coletadas em 28 municípios proveniente de cinco regiões onde a espécie é comumente cultivada, bem como em mercados locais e feiras de vários estados do Brasil. Outros acessos foram obtidos dos bancos de germoplasma *ex situ* pertencentes a ESALQ/USP, IAC e FCA/UNESP. Uma análise descritiva de diferentes agricultores foi realizada, indicando distintos perfis entre as regiões analisadas. Um amplo espectro de nomes populares foi registrado com diferenças entre regiões. As entrevistas com os agricultores revelaram que a espécie tem perdido sua importância em algumas áreas tradicionais locais. O isolamento de marcadores microssatélites polimórficos resultou na detecção de 14 locos de microssatélites (SSR). Destes, dez foram selecionados para caracterizar 80 acessos de *D. alata*. O conteúdo de informação polimórfica foi de 0,39 a 0,78 e o poder de discriminação foi de 0,15 a 0,91. Seis destes marcadores mostraram transferibilidade entre as espécies *D. bulbifera*, *D. cayenensis*-*D. rotundata* e *D. trifida*. Em um estudo de diversidade morfológica e molecular, 12 pares de microssatélites polimórficos (nove desenvolvidos neste estudo e três obtidos da literatura) foram usados para gerar perfis de DNA de cada acesso da espécie e quatro perfis morfológicos foram analisados. A caracterização morfológica mostrou considerável diversidade e nenhum agrupamento específico foi observado entre as regiões. As análises moleculares de *D. alata* mostraram alta diversidade intra-específica nos acessos locais de diferentes regiões do Brasil. Contudo, a estrutura populacional entre as regiões coletadas foi relativamente baixa. Somente acessos da região Centro-Oeste apresentaram um aparente agrupamento regional, resultado quase similar foi observado nos acessos do nordeste. Estes resultados mostram uma mistura de acessos em todas as regiões coletadas, na qual é consistente com a falta de correlação entre as distâncias geográficas e genéticas, sugerindo que as túberas de inhame têm se movido extensivamente pelo fluxo humano. A diversidade genética encontrada pode ser explicada pelo resultado de um contínuo intercâmbio de variedades através do território brasileiro. O desenvolvimento de marcadores moleculares SSR em *D. alata* e análises de genética populacional são essenciais para o avanço de pesquisas nesta espécie. A geração de informação é de grande importância para a identificação, exploração racional e conservação da variabilidade genética da espécie, tanto da forma *in situ* e/ou *ex situ*.

Palavras-chave: Agricultura Tradicional; Diversidade genética; Perfis Morfológicos; Agricultura Sustentável; Variabilidade genética

ABSTRACT

Genetic diversity characterization of water yam (*Dioscorea alata* L.) with microsatellites markers

The genus *Dioscorea* is the largest in the Dioscoreaceae family, featuring approximately 600 species distributed mainly in the tropics, with high importance as food supply in West Africa, Asia southeast, the Caribbean and a few countries in South America. In Brazil, some species of yam (*Dioscorea* spp.) together with cassava (*Manihot esculenta* Crantz), have a profound importance in subsistence agriculture, being used primarily as a source of carbohydrate for human feeding. Little is known about the genetic diversity and structure of these species, and also how it evolved in recent centuries, particularly because of the scarcity of molecular evaluations. The present study is intended to: (i) present socio-economic and ethnobotanical data on the different agriculturists that cultivated the species; (ii) isolate microsatellite primers using an enriched genomic library technique and test for cross amplifications in other species of *Dioscorea*; (iii) analyse the genetic relationships among 73 local accessions and 17 commercial accessions of water yam collected in five different regions in Brazil (South, Southeast, Northeast, Central-West and North) using a set of 12 microsatellite. Tubers of *D. alata* were collected in 28 municipalities from this five regions where the species is commonly cultivated, as well as on local markets and fairs from several states across Brazil. Other accessions were obtained from the *ex situ* germplasm collections belonging to ESALQ/USP, IAC and FCA/UNESP. A descriptive analysis of different farmers was performed, indicating unequal profiles between the screened regions. A wide range of vernacular names were registered with differences between regions. The interviews with the agriculturist revealed that the species are losing their importance in some traditional/local areas. The isolation of codominant polymorphic microsatellite markers resulted in the detection of 14 short tandem repeat (SSR) loci, and ten were selected to characterize 80 *D. alata* accessions. The polymorphism information content varied from 0.39 to 0.78 and the power discrimination ranged from 0.15 to 0.91. Six of the markers showed transferability between the species *D. bulbifera*, *D. cayenensis*-*D. rotundata* and *D. trifida*. In a morphological and molecular diversity study, 12 polymorphic microsatellite primers were used to generate DNA profiles for each accession of the species and four morphological traits were analyzed. The morphological characterization showed considerable diversity and no specific clustering was observed between regions. The molecular analyses of *D. alata* showed a high intraspecific diversity in local varieties from different regions in Brazil. However, population structuring between sampling regions was rather low. Only the accessions from the Central-Western region showed an apparent regional clustering, almost similar were observed with northeast accessions. These results show an admixture of accessions in all sampling regions, which is further consistent with the lack of a correlation between geographic and genetic distances, suggesting that water yam tubers have moved extensively by human fluxes. The genetic diversity found can be explained by the result of a continuous exchange of varieties through the Brazilian distribution range. The development of molecular SSR markers for *D. alata* and genetic population analysis is essential for the ongoing research on this species. The generated information is of great importance for the identification, rational exploitation and conservation of the genetic variability of this species, in a *in situ* and/or *ex situ* way.

Keywords: Traditional agriculture; Genetic diversity; Morphological traits; Local varieties; Genetic variability

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diferentes sistemas de plantio de *Dioscorea alata*. Área de médio porte em Joinville, Santa Catarina usando-se varas de bambu (A) e exploração em covas em Iguape, São Paulo (B) 28
- Figura 2 – Uma placa encontrada em um mercado de Ubatuba, SP, que gera confusão: dois nomes associados à espécie *Dioscorea alata* e o desenho do taro (*Colocasia esculenta*) (A). Túbera de inhame (*Dioscorea alata*) em cima e em baixo um rizoma de taro (*Colocasia esculenta*) (B) 36
- Figura 3 - Parte aérea de quatro espécies do gênero *Dioscorea*: *D. trifida* (A), *D. bulbifera* (B), *D. alata* (C) e *D. cayenensis-rotundata* (D), presentes no banco de germoplasma de raízes e tubérculos do Departamento de Genética (ESALQ/USP)..... 38
- Figura 4 - Locais de coleta de inhame (*Dioscorea alata*) em quatro regiões do Brasil: Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste 71
- Figura 5 - Dados relativos ao estado civil dos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata* 75
- Figura 6 - Dados relativos ao número de filhos dos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata* 76
- Figura 7 - Dados relativos à fonte de renda dos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata* 77
- Figura 8 - Dados relativos à mão de obra usada pelos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata* 78
- Figura 9 - Dados relativos ao tipo da área plantada pelos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata* 79
- Figura 10 - Dados relativos ao tamanho da área plantada pelos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata* 80
- Figura 11 - Dados relativos à realização de pousio pelos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata* 83
- Figura 12 - Gel de agarose (1%) para quantificação de DNA, corado com o corante *Blue Green*, para amostras concentradas e diluídas..... 99
- Figura 13 - Gel de acrilamida (7%) para teste de temperatura considerando três acessos (A, B e C) aleatórios de inhame (*Dioscorea alata*) para oito temperaturas (T1 a T8). 100
- Figura 14 - Gel de agarose (3%) ilustrando a otimização de $MgCl_2$ em três diferentes concentrações para os primers 9C e H12..... 101

Figura 15- Mapa do Brasil indicando os 26 municípios onde 90 acessos de *Dioscorea alata* foram coletados (quadrados [1-17]: acessos comerciais; círculos [18-90]: acessos locais)..... 118

Figura 16 - Géis de acrilamida (7%) com diferentes perfis alélicos. Na parte superior, genotipagem de acessos de *Dioscorea alata* com o primer G4, e na parte inferior, genotipagem de acessos de *D. alata* com o primer 4C. M – marcador de 10 pb 122

Figura 17- Dendograma obtido pelo método neighbor joining mostrando a relação genética entre 73 acessos locais de *Dioscorea alata* de cinco regiões diferentes do Brasil e 17 acessos comerciais a partir de 12 marcadores microssatélites 128

Figura 18 - Variação entre 73 acessos locais de inhame (*Dioscorea alata*) revelada pela análise das coordenadas principais (PCoA) baseado na distância média de agrupamento calculado a partir de 12 marcadores microssatélites 129

Figura 19 – Agrupamento desenvolvido pelo software STRUCTURE com 73 acessos locais de inhame (*Dioscorea alata*) usando diferentes regiões do Brasil (base $K = 2$) 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Municípios, comunidades, coordenadas geográficas, e número de agricultores entrevistados das regiões Sul e Sudeste que cultivam <i>Dioscorea alata</i>	72
Tabela 2 - Municípios, comunidades, coordenadas geográficas, e número de agricultores entrevistados da região Nordeste que cultivam <i>Dioscorea alata</i>	72
Tabela 3 - Municípios, comunidades, coordenadas geográficas, e número de entrevistados da região Centro-Oeste que cultivam <i>Dioscorea alata</i>	73
Tabela 4 - Número de agricultores por Estado para cada variedade citada de <i>Dioscorea alata</i> e o valor total (%) para as citações em cada variedade	84
Tabela 5 - Relação das nove sequências dos microssatélites desenvolvidas para o projeto e o respectivo n.º do GenBank, número de alelos, tamanho e amplitude do produto em pares de base, poder de discriminação (D), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e temperatura de anelamento definidas	105
Tabela 6 - Resultados da amplificação dos nove primers usados para a transferibilidade desenvolvidos para três espécies do gênero <i>Dioscorea</i> , avaliando-se oito acessos de cada espécie	106
Tabela 7 - Informação geral sobre a origem dos acessos de <i>Dioscorea alata</i> usados no estudo	114
Tabela 8 - Relação de 17 acessos comerciais, na qual é apresentado o número de acesso no germoplasma, bem como a origem de coleta (Município e Estado)	115
Tabela 9 - Relação de 73 acessos locais/tradicionais selecionados, na qual é apresentado o número de acesso no banco de germoplasma, bem como a origem do acesso (município, comunidade e estado, e coordenadas geográficas)	116
Tabela 10 - Número de acessos (em parêntesis) para cada grupo e para cada caráter morfológico a partir de dados de 90 acessos de inhame (<i>Dioscorea alata</i>).....	119
Tabela 11 – Caracterização genética dos microssatélites usados nas análises dos acessos de inhame (<i>Dioscorea alta</i>), incluindo número de alelos por locos (A), temperatura de anelamento (Ta), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) para os acessos locais (AL) e acessos comerciais (AC).....	121
Tabela 12 - Parâmetros genéticos dos marcadores microssatélites usados para analisar 73 acessos de inhame (<i>Dioscorea alata</i>) em cinco regiões do Brasil: Sudeste (SE), Sul (S), Centro-Oeste (CO), Nordeste (NE) e Norte (N)	126

Tabela 13 - Análise da variância molecular (AMOVA) gerado por dados SSR a partir de 73 acessos locais de *Dioscorea alata* coletados em 26 municípios de cinco regiões do Brasil 127

Tabela 14 - Análise da diversidade genética gerada a partir do Índice de Shannon entre os acessos comerciais e locais de inhame (*Dioscorea alata*) 131

Tabela 15 – Parâmetros genéticos dos marcadores microssatélites usados para analisar acessos de inhame (*Dioscorea alata*) de quatro regiões do Brasil (SE – Sudeste, S – Sul, CO – Centro- Oeste e NE – Nordeste)..... 131

Tabela 16 – Distância genética para quatro regiões do Brasil (SE – Sudeste, S – Sul, CO – Centro- Oeste e NE – Nordeste) onde é praticado o cultivo de inhame (*Dioscorea alata*)..... 132

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Este projeto teve como intuito dar continuidade aos trabalhos desenvolvidos dentro do programa Biota/FAPESP, intitulado “Coleta, uso e caracterização da diversidade genética de germoplasma de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) e cará (*Dioscorea* spp.) em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira, SP, Brasil”, concluído em 2005. Inserido em dois outros projetos denominados “Caracterização da diversidade genética para marcadores microssatélites (SSR) em etnovariedades de inhame (*Dioscorea* spp.) originárias de roças tradicionais e variedades comerciais”, financiado pela Pró-Reitoria de Pesquisa da USP, através do Programa de Incentivo à Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa da USP, e “Diversidade genética em acessos de inhame (*Dioscorea* spp.) originários de roças de agricultura tradicional e variedades comerciais avaliados por marcadores microssatélites” financiado pela FAPESP (processo nº 2007/04805-2), o projeto de Doutorado, aqui apresentado, visa fomentar e a caracterizar, de forma mais detalhada, um importante tubérculo nacional, porém pouco estudado e compreendido ainda como é a espécie *D. alata*.

O atual projeto contou com a participação dos pesquisadores Prof. Dr. Lin Chau Ming, UNESP; Dr. José Carlos Feltran, IAC; Dra. Teresa Losada Valle, IAC; Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva, URPE; Prof. Dr. Nivaldo Peroni, UFSC; PqC. Antônio Henrique dos Santos, EPAGRI; bem como de vários alunos de graduação e pós-graduação. As regiões de coleta do atual projeto (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste) foram selecionadas baseadas nas informações disponibilizadas pelos pesquisadores acima referidos, nas experiências adquiridas pelo projeto encerrado em 2005, e na pouca informação disponível na literatura sobre as principais regiões produtoras das espécies do gênero *Dioscorea*.

Foram avaliadas, no projeto inicial, etnovariedades de *D. alata* utilizando-se marcadores morfológicos e isoenzimáticos (BRESSAN, 2005). No entanto, estudos com marcadores microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) baseados em análises de DNA têm tornado-se uma importante ferramenta para a identificação de cultivares e caracterização de germoplasma (KARP; EDWARDS, 1997). Como o marcador microssatélite é, em geral, mais abundante no genoma e mais informativo que as isoenzimas, decidiu-se dar continuidade às avaliações de etnovariedades de *D. alata* coletadas junto a agricultores tradicionais do Vale do Ribeira, além de novos acessos coletadas no litoral norte de São Paulo, no município de Ubatuba, em áreas do

litoral em Santa Catarina, e nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Maranhão e Piauí, no Nordeste, e no Estado de Mato Grosso, verificando-se que novas informações poderiam ser obtidas.

O projeto pretendeu avaliar também a diversidade genética de acessos de uso comercial, adquiridas em feiras e varejões de diversas cidades do Estado de São Paulo, e de outros estados brasileiros. A escolha desta espécie, entre as demais, deve-se, sobretudo a ser a mais utilizada como cultura alimentícia entre as espécies do gênero, sendo São Paulo o mais importante Estado produtor de *D. alata* (MOURA et al., 2006).

Partindo do postulado que a conservação genética de variedades tradicionais é parte de um conjunto de políticas cruciais na manutenção da biodiversidade global (WOOD; LENNÉ, 1997), e que dependendo da importância econômica da cultura junto à população, poderemos afirmar que algumas etnovariedades desaparecerão mais cedo ou mais tarde (ZEVEN, 1998), a urgência de uma caracterização mais pormenorizada, do ponto de vista molecular, de espécies negligenciadas/subutilizadas como a *D. alata* faz-se necessária por vários fatores:

- Um germoplasma conservado, seja ele *in situ* ou *ex situ*, serve como um reservatório de genes aos quais os melhoristas podem acessar quando precisam resolver problemas específicos, tal como a resistência a uma doença. Os marcadores são de grande valia para identificar e conhecer melhor a espécie dentro do seu habitat natural, caracterizando e identificando a sua diversidade e variabilidade genética. No entanto, pouco ou nada é sabido sobre os germoplasma de inhame no Brasil. Ações conjuntas entre instituições acadêmicas, de pesquisa e extensão são fundamentais para compreender como essas ferramentas moleculares podem auxiliar na tomada de decisões, de modo que se tenham profissionais gerando e difundindo tecnologias para a cultura e conservação do inhame.
- A rápida erosão genética de etnovariedades¹ em países que cultivam inhame (DANSI et al., 1997), sobretudo pelo aumento das monoculturas e área de pastagens (PEDRALLI, 1994) tem sido uma questão debatida na literatura não só com dioscoreáceas mas com um vasto conjunto de outras culturas. A necessidade de resgate e preservação do conhecimento tradicional para orientar programas de conservação de germoplasma em inhame *in situ*, associado à grande distribuição da espécie no Brasil faz-nos crer que *D. alata*, à semelhança de outras culturas de roças tradicionais, merece uma maior atenção (CARMO, 2002; JARVIS et al., 2000).

¹ No presente trabalho conceituamos o termo “acessos locais” devido a nem todos os acessos coletados estarem inseridos num contexto de agricultura tradicional.

- Marcadores microssatélites têm sido utilizados para avaliar a estrutura genética de várias plantas cultivadas, porém existe uma carência na sua aplicação a espécies negligenciadas/ subutilizadas e na determinação de relação entre seus acessos (MIGNOUNA et al., 2003).

Diante dos fatos apresentados, é necessário definir e priorizar novos projetos para que se criem estratégias de conservação e uso sustentável da diversidade genética existente no Brasil, delineando um panorama abrangente e atual sobre as áreas de ocorrência da espécie *D. alata*, reunindo informações sobre as coleções conservadas fora de suas comunidades naturais (*ex situ*) ou nas condições de conservação existentes na agricultura tradicional (*on farm*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA²

2.1 A agricultura tradicional e a importância dos agroecossistemas

A roça, unidade básica evolutiva da agricultura tradicional onde ocorre a conservação *in situ* das etnovarietades, entre elas muitas espécies do gênero *Dioscorea*, e também onde ocorre a ampliação da diversidade genética que beneficia os agricultores locais (PINEDO-VASQUEZ et al., 2000; MARTINS; OLIVEIRA, 2009), é um patrimônio agroecológico que se tem perdido ao longo dos anos. A migração de comunidades agrícolas para as grandes cidades, a erosão dos solos, o aumento do turismo, o uso abusivo do fogo para abertura de pasto e a monocultura, sobretudo da soja, tem levado muitas roças ao extermínio (PERONI; HANAZAKI, 2002; SIMMONS et al., 2002; KLINK; MACHADO, 2005).

Segundo Arruda (1999), outro problema não menos importante que os anteriores, tem sido colocado pelas dificuldades da remoção e também da permanência em unidades de conservação das populações classificadas como “tradicionais”. Isto é, daquelas que apresentam um modelo de ocupação do espaço e uso dos recursos naturais voltado, principalmente, para a subsistência, com fraca articulação com o mercado, baseado em uso intensivo de mão de obra familiar, tecnologias de baixo impacto, derivadas de conhecimentos patrimoniais e normalmente de base sustentável (ALLEN et al., 1995; BACO et al., 2007).

São muitas as razões que geram o êxodo rural e a migração para as grandes cidades. Há muito que as ciências sociais abordam esta temática, no entanto, outras áreas como a Ecologia e Genética tentam entender os processos e as relações entre o homem e a terra. Fatores bióticos e abióticos são pautados por Nesheim et al. (2006) que questionam sobre o que acontece ao conhecimento tradicional quando grupos de pessoas migram em busca de melhores oportunidades de vida. Como se dá a interação entre pessoas e condições naturais e sócio-culturais proporcionadas pelos diferentes sistemas agroecológicos, e quais os benefícios que o conhecimento tradicional pode trazer às comunidades locais, são algumas das questões levantadas pelo estudo realizado por Nesheim et al. (2006). Sabemos que um dos benefícios que a agricultura tradicional tem fornecido à humanidade é a conservação *in situ* de germoplasma de muitas espécies de importância econômica, mantendo e amplificando ao longo do tempo a variabilidade

² Parte das informações desta Revisão Bibliográfica encontra-se disponível em três trabalhos: (1) SIQUEIRA; VEASEY, 2009 (2) SIQUEIRA, 2011 (3) VEASEY et al., 2011 (no prelo).

genética (MARTINS, 1994; PERONI; SAMBATTI et al., 2001; COOMES; BAN, 2004; MARTINS; OLIVEIRA, 2009).

O desenvolvimento da agricultura moderna, caracterizada por grandes avanços tecnológicos em prol da sociedade moderna tem ignorado, na maioria dos casos, a heterogeneidade ambiental, cultural e socioeconômica da agricultura tradicional. O desenvolvimento agrícola não tem levado em conta as necessidades e potencialidades das práticas agrícolas locais (ALVERSON, 1984; CONWAY, 1985), o que afronta as bases da sustentabilidade que a agricultura tradicional oferece. Um segundo benefício, tão importante quanto, são os princípios extraídos de estudos de agroecossistemas tradicionais que podem ser utilizados para desenhar agroecossistemas sustentáveis em países industrializados e assim, corrigir muitas deficiências da agricultura moderna (ALTIERI, 1987).

Várias estratégias e políticas de conservação de espécies cultivadas são revisadas na literatura. Fora do seu habitat natural, os recursos fitogenéticos se conservam em bancos e coleções de germoplasma. Quando conservado fora do seu habitat, os recursos genéticos recebem a denominação de conservação *ex situ*, e quando conservado dentro do seu habitat natural utiliza-se a denominação de conservação *in situ*, ou de maneira complementar *in situ/ex situ*. Quando a conservação busca também possibilidades de exploração junto aos produtores é denominada *in situ/on farm*. A menos onerosa é a conservação *in situ*. Além de ser mais barata, a conservação *in situ/on farm*, viabilizada pelas roças de agricultores tradicionais, é de fundamental importância não só do ponto de vista genético, mas também para a segurança alimentar e preservação do patrimônio cultural de muitas comunidades (WALTER et al., 2005). Segundo Griffith (1987), a dificuldade de mobilizar os esforços em favor da conservação *in situ* deve-se às características dos bens públicos das reservas florestais e não necessariamente, ao descaso de governos, empresas ou indivíduos. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2011), apesar dos avanços feitos na conservação *in situ* (e de forma complementar, a conservação *on farm*), deve-se reconhecer que a conservação dos recursos genéticos no País, um dos principais países de megadiversidade, está longe da condição ideal. Faltam inventários relativos às instituições (governamentais, não-governamentais e movimentos sociais) envolvidas na conservação *in situ*, *on farm* e *ex situ* de recursos genéticos (fauna, flora e microrganismos); representatividade, tanto em termos regionais quanto nos biomas; infraestrutura existente em cada coleção; nível de uso e intercâmbio de

recursos genéticos, bem como informações sobre as necessidades e as medidas necessárias para a conservação desses materiais a curto, médio e longo prazos.

Assim sendo, a conservação dos recursos genéticos *in situ* pelos agricultores tradicionais tem papel fundamental, levando-se em conta o estreitamento da base genética das espécies cultivadas que vem ocorrendo nos últimos anos, consequência do modelo de agricultura da Revolução Verde, e as limitações da conservação *ex situ*, demasiadamente onerosa e de difícil manutenção (CLEVELAND et al., 1994; SANTOS, 2000).

Esta forma de conservação *in situ* pode ser classificada também como um processo de seleção e de mudanças genéticas contínuas, em vez de uma preservação estática. Os cultivares assim selecionados mantêm-se adaptados às condições do ambiente local, de manejo e a todos os problemas bióticos do cultivo (pragas, doenças e ervas daninhas). Este modelo de conservação de recursos genéticos, e de um sistema agroecológico como um todo, requer que as unidades de produção agrícola e os produtores sejam os repositórios tanto da informação genética como do conhecimento cultural, de como os cultivos são cuidados e manejados. Portanto, o princípio da conservação e/ou manutenção *in situ/on farm* propõe que cada unidade de produção agrícola estimule seu próprio programa de melhoramento e preservação. Na realidade, os produtores devem ser capazes de selecionar e preservar suas próprias variedades adaptadas localmente, onde isso for possível. Como as características de uma região estabelecem critérios importantes de seleção, pode haver certa centralização de programas de seleção para uma determinada área, definida ecológica e geograficamente, desde que a troca constante entre material genético de cultivos agrícolas ocorra entre os produtores daquela região. Essas unidades agrícolas são em grande parte pequenas e médias áreas onde é praticada, de forma plena ou com algumas adaptações modernas, a agricultura tradicional do tipo coivara (WOOD; LENNÉ, 1997; AMOROZO, 2008).

A conservação e/ou manutenção *in situ/on farm*, pode ser praticada em qualquer região e em diversos sistemas agrícolas, no entanto ganha ênfase quando é praticada em regiões onde a população originária do local ainda tem forte influência nas regiões próximas aos centros de diversificação das culturas. Um importante exemplo desta modalidade é o executado pelos índios peruanos com a batata, na região andina, onde é possível encontrar-se atualmente feiras de trocas de sementes, permitindo que a ampliação genética se mantenha viva (RACKER; SPOONER, 2002; SPOONER et al., 2007).

A agricultura tradicional em muitas regiões do Brasil, onde é praticada de várias formas a conservação e/ou manutenção *in situ/on farm*, é caracterizada pelo uso de um ciclo de corte da vegetação em estágio de sucessão secundária, seguido pela queima desta vegetação quando seca, plantio, cultivo, abandono da área após a colheita e o retorno à área após alguns anos (EDEN, 1988, 1993). Esse sistema varia de acordo com as condições ecológicas locais (Figura 1), sendo que em muitas áreas, a prática de derrubada da floresta acontece no período seco, a queima é realizada antes das primeiras chuvas e o plantio de espécies como milho, inhame, mandioca, feijão, taro, é realizado aproveitando as cinzas da queimada e o material em decomposição. Para mais detalhes sobre o tema, Leonel (2000) apresenta uma revisão sobre a origem do uso do fogo pelos indígenas, como sua evolução decorreu até aos dias de hoje, e o seu uso atual pelos agricultores tradicionais.

Muitas espécies são cultivadas na forma de policultivos na mesma área por dois a três anos e o período de pousio varia de cinco a vinte anos, dependendo das condições locais e da densidade populacional, sendo a coivara considerada um dos mais importantes sistemas agroflorestais nos países tropicais (NAIR, 1993). Esse sistema garante uma sustentabilidade de recursos para muitas populações em vias de desenvolvimento (KLEINMAN et al., 1995). Compreender a dinâmica destas áreas e os fatores que afetam esses processos são interessantes sob várias óticas das ciências biológicas (HUI; HAMINTON, 2009).

Figura 1 - Diferentes sistemas de plantio de *Dioscorea alata*. Área de médio porte em Joinville, Santa Catarina usando-se varas de bambu (A) e exploração em covas em Iguape, São Paulo (B)

Segundo Diegues e Arruda (2001), várias culturas tradicionais existem no Brasil e é devido a elas que existe uma grande amplitude de cultivares. A diversidade dessas comunidades rurais, por outro lado, deve-se à grande miscigenação entre povos brancos, negros e índios e a grande

maioria das espécies é mantida por esses agricultores tradicionais de forma a satisfazer suas necessidades, de acordo com o contexto social em que estão inseridos (BELLON, 1996).

Pretty (1995) demonstrou que no continente africano, asiático e sul americano, muitas Organizações Não Governamentais envolvidas na promoção de iniciativas agroecológicas apresentaram impactos positivos na vida de pequenos agricultores tradicionais em comunidades locais, de vários países. Para Wood e Lenné (1997) manter sistemas de agrobiodiversidade, através da dinâmica tradicional, tem impactos não só locais como também globais e, segundo Kumar e Nair (2004), a estrutura e diversidade dos agroecossistemas tropicais é o reflexo de um ambiente biofísico único que conjuga fatores sócio-culturais que ainda predominam atualmente. Os agroecossistemas são repositórios de um grande número de plantas, em pequenas áreas cultivadas com interação direta com seus proprietários, salvaguardando as necessidades econômicas, sociais, e culturais específicas das famílias (sobretudo de baixa renda), interagindo no sequestro de carbono, na conservação biológica, bem como outros incontáveis valores benéficos disponíveis à sociedade (KUMAR; NAIR, 2004; GALLUZZI et al., 2010).

Pesquisas sugerem que em agroecossistemas, a regulação interna de seu funcionamento é produto da biodiversidade de plantas que se dá por fluxos de energia e ciclos de nutrientes, através de sinergismos biológicos. Tal regulação é perdida progressivamente sob intensificação e simplificação do ambiente, promovidos pela monocultura, onde ela é substituída por aporte de insumos químicos (SWIFT et al., 1996). Consequências sobre a perda de biodiversidade como um todo (CHAPIN et al., 2000) e relatos e estudos de fragilidade de agroecossistemas tornam o debate sobre a erosão genética de plantas cultivadas uma urgência que extrapola o meio científico (HAWKES, 1983; PLUCKNETT et al., 1987; HARLAN, 1992; NRC, 1993). Para mais detalhes sobre o assunto, Amend et al. (2008) apresentam vários trabalhos que sublinham a crescente importância e valor sobre os agroecossistemas em diversas regiões do mundo, e Jackson et al. (2007) mostram como pesquisadores de diferentes áreas podem colaborar na determinação de funções e valores da agrobiodiversidade para uma produção agrícola sustentável.

2.2 A importância das culturas negligenciadas no panorama alimentar nacional e mundial

A prioridade dada às culturas ditas economicamente importantes levou à diminuição da diversidade de alimentos disponível à humanidade por muitas gerações. O chamado “paradoxo nutricional” tem sua raiz na “simplificação” da agricultura, um processo que favoreceu algumas

culturas em detrimento de outras, com base em suas vantagens comparativas: desenvolvimento em ampla gama de *habitats*, necessidades simples de cultivo, armazenamento e processamento fáceis, propriedades nutricionais, sabor, entre outros (TREWAVAS, 2001).

As espécies ditas “órfãs”, negligenciadas ou subutilizadas ganham importância entre as comunidades agrícolas, sobretudo entre as comunidades tradicionais. Essas culturas não são economicamente competitivas com as culturas que suprem a alimentação mundial (e naturalmente não possuem um valor agregado no mercado), não são apoiadas por sistemas de fornecimento de sementes, tecnologia de produção, de pós-colheita, bem como serviços de extensão, e se tornam em muitos casos, iguarias locais para consumidores que estão acostumados a usá-las (PADULOSI; HOESCHLE-ZELEDON, 2004). Hoje, cada região brasileira possui os seus pratos típicos e muitos deles têm como ingredientes básicos recursos alimentares que podem ser considerados como subutilizados e/ou negligenciados (MELO, 2007).

Na Mesoamérica, a marginalização de cultivares teve inúmeras razões, mas segundo Bermejo e León (1994), a introdução de cultivos exóticos e de genótipos modernos foi a causa mais drástica. O processo de marginalização em plantas usadas na dieta alimentar tem sido contínuo e longo. O preparo culinário e hábitos alimentares praticados desde a infância fizeram com que algumas plantas se instalassem na vida de populações tradicionais. Contudo, mudanças sociais profundas nessas regiões levaram a alterações desses hábitos. Cultivares indígenas da América do Sul foram substituídas por cultivares modernas que acabaram por ser aceitas primeiramente nos grupos dominantes e consecutivamente pelos grupos de base. Bermejo e León (1994) ressaltam que na maioria dos lugares apenas só as comunidades mais pobres e as populações indígenas mantêm (ainda) cultivares tradicionais e os seus usos.

Para ser considerada negligenciada ou subutilizada, uma espécie deve preencher alguns requisitos: necessidade de poucos insumos externos para sua produção; adaptação à produção orgânica; cultivável em áreas marginais; contribuir para a estabilidade dos ecossistemas frágeis; integrável ao sistema produtivo dos agricultores familiares; importância tradicional local ou regional; fácil de armazenar e processar; aptidão ao mercado regional/local; e possível potencial com relação ao valor nutritivo e/ou medicinal; entre outros (GFUS, 2007). No entanto, parece que a maior premissa, pelo menos do ponto de vista acadêmico, e que essas referidas culturas negligenciadas/ subutilizadas padecem de estudos científicos.

Para Melo (2007), a maior parte dessas olerícolas possui grande variabilidade genética devido ao processo de manutenção local das variedades. Ao mesmo tempo, estão vulneráveis ao processo de erosão genética por causa do êxodo rural, já que são mantidas, tradicionalmente, por pequenos agricultores e cultivadas para consumo familiar. Caso essas espécies deixem de ser cultivadas, esses germoplasma *in situ* podem-se perder. A importância da coleta dessas culturas negligenciadas ou subutilizadas, já que muitas variedades locais poderão ser resgatadas e preservadas, e mantidas em bancos de germoplasma *ex situ*, torna-se uma ferramenta de extrema significância na conservação e manutenção destas espécies.

Pesquisas relacionadas as olerícolas negligenciadas ou subutilizadas, com enfoque no melhoramento genético ou na genética de populações, com fins de conservação são escassas. Deste modo, torna-se difícil precisar o grau de diversidade genética entre e dentro de regiões onde essas culturas são mantidas. Não obstante, e segundo Abramo (1990) e Mnzava et al. (1997), as hortaliças subutilizadas, entre as quais se inserem estas olerícolas, têm méritos importantes que incluem: valor nutricional, valor ecológico, valor agrônômico, segurança alimentar, valor cultural e geração de emprego. No entanto, para Cascudo (1983) muitas desses tubérculos já padecem historicamente de um esquecimento como é relatado no seu clássico trabalho “História da Alimentação do Brasil”.

A introdução de várias espécies e variedades de olerícolas, além de diversificar a alimentação dos primeiros colonizadores, serviu de material básico para o melhoramento genético, na busca por uma melhor adaptação destas espécies às diferentes condições edafoclimáticas encontradas no Brasil. Outras introduções tornaram-se indispensáveis à culinária regional em algumas regiões brasileiras. Outra contribuição, esta indireta e pouco honrosa para os colonizadores portugueses, mas que ocorreu de fato e que hoje resultou no enriquecimento ainda maior do miscigenado povo brasileiro, foi o fluxo de inhames trazidos pelos escravos africanos (MADEIRA et al., 2008).

A mandioca e a batata-doce, por exemplo, cultivadas por povos indígenas da América do Sul, sempre foram a base de suas dietas alimentares e a partir de vários sistemas de cultivo tradicional têm-se criado variedades regionais a partir de um conhecimento local, muitas vezes centenário e pouco compreendido (BRUSH, 2005). Foi através das rotas migratórias de povos indígenas e de colonizadores europeus que muitas cultivares foram incorporadas e amplamente cultivadas até os dias de hoje (CASCUDO, 1983), sendo que a mandioca, a batata-doce e o

inhame merecem um destaque especial por sua dispersão e cultivo em praticamente todo território nacional (SIQUEIRA; VEASEY, 2009).

Os valores alimentícios dos produtos negligenciados e subutilizados precisam ser melhor pesquisados e divulgados. Atualmente, estamos vivendo uma época de busca por produtos saudáveis, de origens conhecidas e que contribuam para a um modelo de sustentabilidade ambiental. Os paradigmas e tabus alimentares precisam ser repensados. Mas para uma mudança real de hábitos coletivos e sociais é preciso investir em pesquisas básicas e aplicadas e, sobretudo, em programas educativos através dos meios de comunicação de massa que talvez pudessem reverter os preconceitos e criar um orgulho nacional na utilização dos recursos naturais existentes (ainda) no país. Contudo, além da necessidade ao estímulo de políticas agro-sustentáveis e ações de *marketing* há, naturalmente, a necessidade de procurar preços competitivos, de um incremento ao controle de qualidade desses produtos e, finalmente, de uma produção em maior escala, criando assim resposta aos mercados exigentes (CARDOSO, 1997; CLAY et al., 2000; CLEMENT et al., 2001).

São poucas as instituições atualmente envolvidas com pesquisas relacionadas às culturas ditas negligenciadas e/ou subutilizadas. É urgente a necessidade de estimular estudos e pesquisas aprofundadas, para que se compreendam os fatores que interferem na evolução dessas espécies e como a diversidade genética destas se encontra distribuída atualmente. A literatura existente sobre essas olerícolas é escassa e encontra-se descompassada da realidade, obrigando o pesquisador e interessado por essas culturas a um intenso exercício de análise do que é informação correta e errônea.

Partindo da realidade de que raros são os projetos de pesquisa em andamento no país, e com o propósito de resgate e valorização no que tange ao melhoramento e conservação dessas espécies, o Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” na Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), nos últimos anos, a partir do seu germoplasma de raízes e tubérculos, tem buscado contribuir com novas informações sobre a caracterização morfológica e molecular de espécies de propagação vegetativa. Trabalhos realizados com mandioca (FARALDO et al., 2000; MÜHLEN et al., 2000; SAMBATI et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2009, 2010), batata-doce (VEASEY et al., 2007, 2008; FABRI, 2009) e inhame (BRESSAN, 2005; BRESSAN et al., 2005; VEASEY et al., 2010) trouxeram resultados que permitiram avaliar

e estruturar acessos, bem como inferir sobre o grau de diversidade dos materiais até então analisados.

Desse referencial teórico e explicações sobre algumas das características e razões da marginalização dessas olerícolas, torna-se fácil entender porque o inhame se destaca como uma das principais culturas apontadas como negligenciadas ou subutilizadas no Brasil. Por não ser incluída no rol das ditas culturas nobres, a exploração do inhame não é contemplada nas políticas agrícolas importantes, apresentando carência de apoio técnico e de crédito, normalmente destinado às monoculturas de produtos exportáveis (PEIXOTO NETO et al., 2000; RITZINGER et al., 2003).

O incentivo ao cultivo de inhame, entre as várias formas já aqui citadas, induzirá produtores a especializarem-se na produção de túberas-sementes de boa qualidade. Agricultores que outrora plantaram inhame podem retomar o cultivo se este for rentável, e se o ciclo for bem sucedido. Programas de melhoramento bem como novas pesquisas fitotécnicas que forneça respostas aos problemas de campo fazem-se necessários. A perda genética de acessos importantes, e algumas vezes raros é devido a programas de melhoramento mal planejados e articulados, e naturalmente pela falta de atenção dada as comunidades tradicionais que mantem em reservatórios genéticos muitas vezes inexplorados. Como essas comunidades se constituem em pequenas propriedades, há uma limitação de recursos destes agricultores para a produção em maiores escalas. Para que muitas destas comunidades melhorem sua produção e consecutivamente, tenha uma renda mais satisfatória, alternativas para a produção e escoamento do que é cultivado são apresentados em alguns estudos. A agroindústria artesanal, por exemplo, é uma alternativa para agregar valor à produção, viabilizando assim a renda familiar, a inclusão social e inibindo o êxodo rural (CARMO, 2002; MELO, 2007).

2.3 Classificação botânica e taxonômica de *Dioscorea* spp

O inhame (*Dioscorea* spp.), da classe Monocotiledônea, e família Dioscoreaceae, possui vários níveis de ploidia. O número básico de cromossomos das espécies de *Dioscorea* é considerado $x = 10$ e $x = 9$, com alta frequência de espécies poliplóides (ESSAD, 1984, citado por BOUSALEM et al., 2006). Espécies tetraplóides são mais frequentes, seguidas de 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 números básicos de cromossomos, $x = 6$ (SEGARRA-MORAGUES et al., 2004) e $x = 20$ para *D. cayenensis-rotundata* (SCARCELLI et al., 2005) e *D. trifida* (BOUSALEM et al., 2006, 2010). 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). No entanto, como referem Arnau et al. (2009) vários níveis de ploidia para *D. alata* podem ser observados, apresentando o estudo destes autores uma taxa de 76% de acessos com $2n = 40$, 7% com $2n = 60$ e 17% com $2n = 80$. Estudos meióticos em *D. alata* foram conduzidos por Abraham e Nair (1991) e Abraham (1998) com variedades $2n = 40$ e $2n = 60$. Os autores observaram formação de bivalente em $2n = 40$ e trivalentes em $2n = 60$ e concluíram que esses materiais podem ser considerados alotetraploides e autohexaploides, respectivamente. Para Obidiegwu et al. (2009c), o desenvolvimento e a aplicação da citogenética molecular em inhames vai melhorar muito a compreensão da estrutura dos cromossomos e a variação do cariótipo dentro das espécies..

Os inhames, incluindo as espécies usadas para alimentação, constituem a alimentação básica para mais de 100 milhões de pessoas em todo mundo, sobretudo nos trópicos úmidos e sub-úmidos (LEBOT, 2009). O gênero *Dioscorea* possui o maior número de representantes da família Dioscoreaceae, principalmente nas regiões tropicais (JOLY, 1998). Contém mais de 600 espécies, 14 das quais têm seus tubérculos utilizados como alimento (SEAGRI, 2002), porém seis têm expressividade como espécies cultivadas pelos trópicos (MONTALDO, 1991). 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, 2002a).

A origem dos nomes vulgares das espécies muitas vezes é obscura ou mesmo impossível de ser identificada, sobretudo aqueles nomes que acompanham as plantas cultivadas. São muitas variedades que têm séculos de domesticação, levadas dos seus locais de origem, domesticadas em sua região de origem ou em outras regiões, ganhando por onde passaram novos nomes atribuídos pelo povo. A designação nativa de *ká rá*, em Tupi, poderá ser a origem da terminologia atual para “cará” em algumas regiões do Brasil (MESQUITA, 2002). Muitas cultivares têm sido referenciadas pelos seus nomes populares há séculos, utilizando-se, geralmente, algum atributo morfológico, referência ao uso, local de ocorrência ou indicação de ordem pessoal. Assim, os

nomes populares variam de local para local, de região para região, de um país para outro podendo, uma mesma variedade, ter diversas denominações e uma denominação ser comum para diversas variedades. Por esta razão é imprescindível conhecer o nome científico de cada espécie, conforme previsto no "Código Internacional de Nomenclatura Botânica" e então procurar correlacioná-lo ao nome popular, ou vulgar (GREUTER et al., 1994; PEDRALLI et al., 2002; SIQUEIRA 2011).

O taro (*Colocasia esculenta* L.) e algumas espécies de inhames (*Dioscorea* spp.) foram culturas introduzidas pelos colonizadores europeus e cultivadas atualmente em todo território brasileiro. Entretanto, o nome dado a essas olerícolas é popular e definido regionalmente, fazendo com que haja uma desuniformidade nos conceitos e nas informações, principalmente na literatura nacional e nas publicações de dados estatísticos.

Com o intuito de padronizar a nomenclatura dessas plantas, a Assembléia Geral do “I Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Cará”, realizado em Venda Nova do Imigrante, ES, em 2001, deliberou que no meio técnico-científico nacional, a partir dessa data o “cará” (*Dioscorea* spp.), cujo tubérculo é muito cultivado nas regiões Norte/Nordeste do Brasil, passaria a ter a denominação definitiva de *inhame*, sendo que o “inhame” (*Colocasia esculenta*), como é popularmente conhecido no Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiro, passaria a ter a denominação de *taro*. As cultivares comuns de inhame (cará-da-costa, cará de São Tomé, cará-do-ar, cará-moela, cará doze-meses, cará barbado, cará de espinho, entre outros) seriam consideradas a partir da data como cultivares de inhame (*Dioscorea* spp.) (CARMO, 2002; CEREDA, 2002; PEDRALLI et al., 2002).

Assim sendo, ficou estabelecido que os órgãos governamentais, universidades, empresas de pesquisas e de extensão rural, a Associação Brasileira de Horticultura e as demais entidades ligadas ao setor agrícola, oficializem e divulguem, no âmbito técnico-científico nacional, a nova nomenclatura (PEDRALLI et al., 2002). A confusão classificatória, distinguindo-se dioscoreáceas de aráceas talvez seja irremediável como assinala Cascudo (1983), descrevendo historicamente um conjunto de desentendimentos sobre as espécies em causa. Atualmente, a problemática está longe de ser resolvida.

A empresa Elma Chips lançou no mercado no ano de 2007 um produto em que na capa constava a imagem da espécie *Colocasia esculenta* (o taro) com a designação de *inhame*. Este acontecimento levou à contestação da comunidade científica brasileira com base na nova nomenclatura adotada em 2001. Em vários comércios locais, no Brasil, é passível de ser observada

essa confusão entre inhame e taro, gerando dificuldade de compra por parte do consumidor que desconhece as espécies em causa (Figura 2).

Figura 2 – Uma placa encontrada em um mercado de Ubatuba, SP, que gera confusão: dois nomes associados à espécie *Dioscorea alata* e o desenho do taro (*Colocasia esculenta*) (A). Túbera de inhame (*Dioscorea alata*) em cima e em baixo um rizoma de taro (*Colocasia esculenta*) (B)

A propósito, na carta de Pero Vaz de Caminha enviada ao El Rey D. Manoel, com data de 1º de maio de 1500, há um equívoco reparado tempos mais tarde pelos historiadores. No trecho “*E não comem senão deste inhame, de que aqui há muito...*”, ao mencionar inhame, na verdade, a referência correta seria à raiz da mandioca. A confusão, ao que parece, é explicada pela semelhança entre a raiz de mandioca e as túberas de inhame descascadas (CASCUDO, 1983).

Ocorre que o inhame (*Dioscorea* spp.) já era conhecido em Portugal naquela época. No entanto, só seria introduzido em terras brasileiras a partir do continente africano anos mais tarde. Na verdade, foram os traficantes de escravos e mercadores que trouxeram da África para o Brasil, além do inhame, outras olerícolas que constituem ingredientes importantes da culinária regional de influências luso-africanas, baiana e mineira (MADEIRA et al., 2008).

A falta de identificação do inhame extrapola fronteiras. Os Estados Unidos da América, consumidores deste tubérculo, referem problemas de sinonímia com a batata-doce (*Ipomoea batatas*), tornando impossível criar dados estatísticos sobre esses produtos no país (VINNING, 2003).

Taxonomicamente, *Dioscorea* é subdividido em várias seções:

1. Enantiophyllum - *Dioscorea alata* L, *Dioscorea opposita* Thunb, *Dioscorea japonica* Thunb e o complexo³ *Dioscorea rotundata* Poir. - *Dioscorea cayenensis* Lam.
2. Lasiophyton - *Dioscorea dumetorum* (Kunth) Pax e *Dioscorea hispida* Dennst.
3. Opsophyton - *Dioscorea bulbifera* L.
4. Combilium - *Dioscorea esculenta* (Lour) Burk.
5. Macrogynodium - *Dioscorea trifida* L.

Um aspecto morfológico importante das plantas da seção Enantiophyllum caracteriza-se pelo enrolamento das ramas no sentido horário. Todas as outras seções caracterizam-se pelas ramas enrolarem-se no sentido anti-horário. Essa característica é muito importante para a classificação das plantas, pois é um aspecto levado em consideração para a elaboração de chaves botânicas (WILSON, 1988).

Os inhames da espécie *D. alata* apresentam nas hastes quatro ou mais fileiras de expansões da epiderme, as “asas”, folhas ovais, opostas, cordada, acuminada, glabrosa, com cerca de 10-30 x 5-20 cm, pecíolo de 6-12 cm de comprimento, sendo que muitas variedades apresentam diversas graduações de coloração purpúrea nas folhas. O formato dos tubérculos de *D. alata* é muito variável, embora predomine o formato cilíndrico, com polpa normalmente branca, existindo desde coloração creme a purpúrea (ARAÚJO, 1994; PEIXOTO NETO et al. 2000). Ainda, segundo Araújo (1994), a maioria das espécies não floresce normalmente, sendo que aquelas que o fazem apresentam inflorescências masculinas do tipo panícula e femininas do tipo espiga. Já Peixoto Neto et al. (2000) descrevem que as flores são globosas com inflorescências axilares; flores masculinas simples, solitárias, glabras e pequenas espigas sendo que as túberas são cilíndricas e de tamanho variável, geralmente de 5-10 kg.

Segundo Corrêa (1978), as plantas de *D. alata* são trepadeiras glabras de caule quadrangular ou tetra-alado (o dos indivíduos femininos geralmente bi-alado) grosso e com pequenos bulbilhos axilares; as folhas são quase sempre opostas, estipuladas, longo-pecioladas, cordiforme, sagitada na base e acuminada no ápice, 5-7 nervada, membrana glabra, de dimensões bastante variáveis. A inflorescência masculina é disposta em espigas compostas, alongadas, flores esverdeadas, estames férteis em número de seis; já o fruto é uma cápsula coriácea de 3 cm, as sementes são orbiculares, circuladas por asas. Geralmente fornece apenas uma túbera, porém às

³ Devido a uma controvérsia na literatura com relação a se considerar ou não *D. cayenensis* e *D. rotundata* como espécies distintas, neste trabalho será apresentado ambas como complexo “*D. cayenensis-rotundata*”. Para mais detalhes vide Ramser et al. (1997) e Dansi et al. (1999).

vezes estas são sublobadas de forma e dimensões muito variadas, podendo alcançar até 60 cm de comprimento, e é comum encontrar no mercado, túberas com 2 a 5 kg. As túberas são revestidas de epiderme de cor castanha e têm na maioria das variedades a cor de polpa branca. O florescimento em condições brasileiras é raro e a floração, quando ocorre, produz frutos como cápsulas deiscentes e a polinização é entomófila.

2.4 Origem e domesticação de *Dioscorea* spp

Embora seja elevado o número de espécies de *Dioscorea*, cinco delas são consideradas de grande importância na alimentação humana: *D. cayenensis-rotundata*, *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta* e *D. trifida*. (Figura 3).

No Brasil observa-se o consumo de todas as espécies acima referidas à exceção de *D. esculenta*. Deste grupo, apenas *D. trifida* é originária do continente americano, tendo como provável centro de origem a América Central, embora o Brasil também seja considerado centro de origem desta espécie. Piperno et al. (2000) apontam que a espécie *D. trifida* já era consumida na América do Sul a 7 mil anos juntamente com outras espécies de tuberosas como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e a taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). As outras espécies cultivadas de *Dioscorea* são originárias da África (*D. cayenensis-rotundata*⁴), Índia Central (*D. alata* e *D. esculenta*) e região Indo-Malaia (*D. bulbifera*) (MONTALDO, 1991; MONTEIRO; PERESSIN, 2002).

Figura 3 - Parte aérea de quatro espécies do gênero *Dioscorea*: *D. trifida* (A), *D. bulbifera* (B), *D. alata* (C) e *D. cayenensis-rotundata* (D), presentes no banco de germoplasma de raízes e tubérculos do Departamento de Genética (ESALQ/USP)

A escassez de documentos que permitem uma análise rigorosa sobre a origem da espécie *D. alata* é um fato. Os trabalhos iniciais sobre a origem de *Dioscorea* spp. foram obtidos a partir

estudos sobre caracteres morfológicos (BURKILL, 1960). Pouco tempo depois, segundo Coursey (1967), esse gênero teve uma ampla dispersão no Cretáceo, que após a separação do Velho e Novo Mundo, se intensificou a especiação do gênero. Durante o século XVI, através da colonização Européia, portugueses e espanhóis tiveram um papel importante na dispersão das espécies. Devido à presença de vitamina C nos túberculos, funcionava como um valioso alimento antiescorbuto em longas viagens. Durante muito tempo, foi utilizado nas viagens pelos oceanos Índico e Pacífico pelos povos autóctones e, mais tarde, pelos portugueses e espanhóis (PERSEGLOVE, 1972).

A espécie *D. alata* nunca foi encontrada no estado selvagem e é incapaz de se cruzar com outras espécies do gênero *Dioscorea*. Os pesquisadores acreditam que seja uma cultura derivada exclusivamente da seleção humana a partir de formas selvagens, embora não existam evidências concretas sobre este fato (HAHN, 1987). Para Vavilov (1951), citado por Montaldo (1991), a espécie *D. alata* originou-se em Myanmar e Assam, na Índia (Ásia).

Segundo Barrau (1962), *D. alata* pode ter sido domesticada na Indochina onde dois dos seus ancestrais, *D. hamiltonii* Hook. e *D. persimilis* Prain e Burk., ocorrem na forma selvagem. Não obstante, Coursey (1976) observou que o principal centro de diversidade da espécie situa-se na Nova Guiné e nas Ilhas Salomão. Lebot et al. (1998) analisaram a variação isoenzimática entre 269 cultivares de *D. alata* originárias dos Caribes, América do Sul, África, Ásia e Melanésia e nenhuma subdivisão clara foi obtida, quer geograficamente, quer morfológicamente. Pelo exposto até aqui, fica claro que o verdadeiro centro de origem é controverso, e estudos mais refinados são necessários.

A classificação infra-específica de *D. alata* é complexa e a relação genética entre as cultivares próximas é difícil de ser explicada. De acordo com Martin e Rhodes (1977), citado por Lebot et al. (2006), o centro de diversidade de *D. alata* surge na Nova Guiné, que parece ser o centro de origem da espécie. A existência de variabilidade morfológica, enzimática e físico-química, observada entre cultivares de *D. alata*, não é o resultado apenas de mutações somáticas, mas a recombinação sexual contribuiu também com grande peso. Zimogramas indicaram que, no passado, *D. alata* teve uma reprodução sexual ativa e alguns cultivares podiam estar muito relacionados. Devido a sua floração de ocorrência natural na Melanésia (região do oeste do Oceano Pacífico), é de se assumir que esta é uma área de grande diversidade, bem como possível área de origem para a espécie (LEBOT et al., 2006).

Alguns trabalhos com a finalidade de preservação *in vitro* de *D. alata* têm sido realizados com sucesso, porque sua conservação em bancos de germoplasma, além de se tornar dispendiosa, tem os inconvenientes dos riscos de incidência de doenças e erosão genética (RODRÍGUEZ et al., 2003). Sendo a Malásia um dos principais centros de origem da espécie, Hasan et al. (2008) identificaram uma grande variedade de caracteres morfológicos dentro da espécie *D. alata*, e ressaltaram a gravidade da erosão genética bem como a implementação de políticas de conservação de recursos genéticos.

2.5 Importância econômica de *Dioscorea* spp.

Dentre as espécies de inhame cultivadas, as mais importantes por suas túberas comestíveis são: *Dioscorea cayenensis-rotundata*, *D. alata*, *D. trifida* e *D. esculenta*. A espécie *D. bulbifera*, muito apreciada pelos indígenas e mesmo pelo homem contemporâneo, não tem sido explorada comercialmente, porém pode ser encontrada em várias roças e quintais de alguns Estados do Brasil (SANTOS, 1996).

A produção mundial de inhame foi, em 2009⁵, de 54,09 milhões de toneladas, sendo a África a maior responsável por essa produção mundial, sendo a Nigéria, Costa do Marfim, Gana e Benim os países que mais se destacam (BACO et al., 2007). Na América do Sul tem-se a Colômbia, o Brasil e o Haiti como os principais produtores. A produção brasileira, em 2007, foi de 250 000 toneladas em uma área cultivada de 27 000 ha (FAOSTAT, 2009). A maior produção de inhame no Brasil ocorre no Nordeste, especialmente nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Piauí, seguidos de outros de menor importância. Os agricultores dessas regiões cultivam basicamente a espécie *D. cayenensis-rotundata*, conhecida vulgarmente como “inhame-da-costa”, embora sejam utilizados também alguns clones de *D. alata*, como o “inhame São Tomé” e o inhame “corneta”. Vale ressaltar que ocorre em menor escala o cultivo do inhame “mimoso” ou “inhambu” (*D. trifida*)⁶ e do inhame “fígado” (*D. bulbifera*) (CARVALHO; CARVALHO, 1999), conhecido popularmente também como “cará do ar” ou “cará moela”.

No Estado de São Paulo, as principais regiões produtoras, responsáveis por 90% da produção, são: Campinas, Mogi Mirim e São José do Rio Preto (MONTEIRO, 2002). *D. alata* é a

⁵ Os dados apresentados aqui são os mais recentes fornecidos pela Food and Agriculture Organization of the United Nations, no entanto esse número não discrimina quais as espécies de inhame. Desta forma, não existe um número real e atualizado do cultivo apenas e só da espécie *Dioscorea alata*.

⁶ É também encontrado na literatura o termo “mimoso” associado à espécie *D. alata*.

espécie de uso comercial no Estado de São Paulo, na qual se classificam vulgarmente as cultivares cará Mimoso (tubérculos com boa aparência, uniforme, casca lisa, polpa amarelada e de ótima qualidade quando cozidos, porém suscetível à requeima), cará Florida (tubérculo de ótima qualidade para o mercado consumidor [pode ser uniforme e ter casca lisa], resistente a requeima e de ciclo precoce) (ZÁRATE et al., 2002) e cará Caipira (tubérculos de má aparência, com casca áspera e de cor escura, produzindo grande quantidade de tubérculos pequenos e de qualidade culinária inferior). Geralmente, as cultivares de *D. alata* são muito produtivas. A estimativa de rendimento situa-se entre 10 a 15 kg de túberas/planta/ano (MARTIN, 1972).

Estudos enfatizam os prejuízos causados na produtividade do inhame, e os cuidados a ter especificamente com esta cultura, já que a espécie *D. alata* é muito sensível a variações no fotoperíodo e em mudanças de data de plantio (RITZINGER, 2003, MARCOS et al, 2011). Como o continente africano se destaca por sua elevada produção e uso, a maioria das pesquisas são realizadas com base nos problemas desses países, sobretudo as que abordam a antracnose (MIGNOUNA et al., 2002a; ABANG et al., 2003; AMUSA et al., 2003; EGESI et al., 2007), e o vírus de maior impacto na cultura do inhame conhecido como o “mosaico do inhame”, possivelmente com origem no complexo *D. cayenensis-rotundata*, mas que evoluiu ao longo dos anos para espécies como *D. alata* e *D. trifida* (BOUSALEM et al., 2000; MIGNOUNA et al., 2002a).

A questão do intercâmbio de acessos de inhame entre germoplasma de diferentes regiões, e a possibilidade de contaminações virais, tem promovido a utilização de técnicas mais eficientes para a detecção desse tipo de doenças (KENYON et al., 2008). No Brasil, outros problemas foram diagnosticados por Andrade (2007) ressaltando que a espécie *D. alata* teve alta incidência de ataque da lagarta das folhas (*Pseudoplusia oo*), tendo outras doenças apresentado índices mais reduzidos. Outros trabalhos visaram obter resultados sobre o fotoperíodo na produção de micro-tubérculos (JEAN; CAPPADOCIA, 1991), estabelecimento de protocolo de micropropagação e organogênese (ROYERO et al., 2007) e tolerância a condições de alta salinidade (WHEATLEY et al., 2003), todos no sentido de obter maior produtividade e túberas de melhor qualidade.

Seu valor nutricional na alimentação humana reside, notadamente, na sua riqueza em vitaminas do complexo B e carboidratos, além de conter significativos teores de vitamina A e vitamina C (ácido ascórbico). É também uma importante fonte de minerais, contendo altos teores de potássio, sódio, magnésio, fósforo e cálcio e, em menor quantidade, o ferro, manganês, cobre e

zinco (SANTOS, 1996). Análises sobre a qualidade do amido em diferentes acessos de *D. alata* na Jamaica permitiram inferir sobre as diferentes propriedades físico-químicas deste tubérculo. O estudo ainda ressaltou a possibilidade de se formular dietas para diabéticos e pessoas com outros problemas de saúde (RILEY et al., 2006).

Observou-se que muitas espécies de *Dioscorea* selvagens, apesar da grande maioria não ter valor alimentar, contém saponinas esteroidais (diosgenina) cuja estrutura química tem a mesma constituição que os corticosteróides (cortisona, hormônios sexuais e contraceptivos). Por essa razão, muitas espécies de *Dioscorea* são também cultivadas por suas propriedades medicinais, na seguinte ordem de importância: *D. bulbifera*, *D. cayenensis-rotundata*, *D. dumentorum* (Kunth) Pax, *D. alata*, *D. trifida*, *D. laxiflora* Griseb e *D. microbotrya* Griseb (PEDRALLI, 2002b). Wu et al. (2005), analisando o consumo de *D. alata* por mulheres em pós-menopausa, concluiu que apesar de os mecanismos ainda não estarem totalmente entendidos, o seu consumo reduz os riscos de câncer de mama e doenças cardiovasculares.

A família Dioscoreácea é conhecida mundialmente pelos seus múltiplos usos na medicina tradicional. O nome desta família deveu-se a Pedâneo Dioscórides, autor greco-romano do século I, que foi considerado o fundador da Farmacognosia. Sua obra *De Matéria Medica*, foi a principal fonte de informação sobre drogas medicinais até o Séc. XVIII. Dividida em cinco livros, nela se descrevem cerca de 600 plantas, 35 fármacos de origem animal e 90 de origem mineral, dos quais 100 ainda são considerados como tendo atividade farmacológica (RIDDLE, 1985).

Dentre muitas das propriedades medicinais dos inhames, destaca-se a prevenção de doenças como a malária, febre amarela e dengue. Algumas espécies têm valor farmacológico utilizado no controle de problemas estomacais (adstringente), desnutrição e convalescença (nutritiva e energético), controle do colesterol, infecções fúngicas, bacterianas e viróticas, arteriosclerose cerebral, diabetes, síntese de contraceptivos orais, hormônios sexuais, cortisona (para tratamento de artrite reumática, alergias e doenças reumáticas), na prevenção de osteoporose, anti-helmíntica, anti-tumoral, diurética e hipoglicemia (SEAGRI, 2002; CHANG et al., 2004). A medicina tradicional utiliza várias espécies de inhames para erupções da pele acreditando na limpeza de impurezas. Os nutricionistas destacam a importância do uso em pacientes anêmicos, dada a sua relativa riqueza em ferro. Em vários lugares onde existe o cultivo de inhame, foi constatado que esses tubérculos são responsáveis pelo aumento de fertilidade das mulheres que os consomem habitualmente (BALBACH; BOARIM, 1993; WU et al., 2005).

Segundo Purseglove (1972), o interesse em saponinas esteroidais cresceu rapidamente visto que se constituiu em uma fonte importante na fabricação de contraceptivos orais. As principais espécies utilizadas como fonte de diosgenina são: No México, *Dioscorea composita* Hemsl., *D. floribunda* Mart. & Gal. e *D. mexicana* Guillem; na Índia, *D. deltoidea* Wall. e *D. prazeri* Prain & Burk e na África do Sul, *D. elephantides* (L. Hér) Engl. e *D. sylvatica* Eckl. Uma grande revisão sobre as atividades químicas e biológicas das saponinas esteroidais em *Dioscorea* spp. foi realizada por Sautour et al. (2007). Espécies pouco relevantes começaram a ter sua importância reconhecida, como é exemplo a *D. balcanica*, da qual é possível extrair diosgenina. Esta é uma substância cristalina, esteroide, encontrada em certos tipos de tubérculos e em algumas espécies de inhame, sobretudo em *D. bulbifera* (NARULA et al., 2007; WANG et al., 2009).

Os fitosteróis são compostos muito utilizados nas indústrias farmacêuticas, encontrados somente em algumas plantas, assemelhando-se muito à estrutura molecular do colesterol, contudo, ao contrário do colesterol, não são absorvidos facilmente pelo corpo, o que os torna compostos de alta relevância medicinal. *D. balcanica* é uma espécie endêmica dos Balcãs e encontra-se atualmente protegida pelo fato de evidenciar uma riqueza genética ainda inexplorada dentro do gênero *Dioscorea* (FODULOVICÉ et al., 1998).

2.6 Marcadores microssatélites

Durante as últimas duas décadas, o papel da genética na biologia da conservação e na ecologia em geral, tem sido muito enfatizado (HEDRICK, 2001; FRANKHAM, 2005). As modernas técnicas de genética molecular possibilitaram a exploração dos chamados marcadores de DNA que são extremamente úteis na identificação e caracterização molecular de indivíduos, seja no melhoramento genético seja na genética da conservação (VIANA et al., 2003; AGARWAL et al., 2008).

Antes dos marcadores moleculares, os marcadores morfológicos foram os primeiros a serem utilizados como forma de identificar características que pudessem discriminar diferenças entre espécies de plantas. Desde os tempos de Mendel, esses marcadores de fácil identificação visual foram considerados de acessível detecção e normalmente determinados por um único gene. Como exemplo, temos o nanismo, a deficiência em clorofila, a cor das pétalas, entre outros. Porém, esses marcadores frequentemente são afetados pela ação gênica de dominância, efeito

ambiental, pleiotropia e epistasia. Além disso, seu número reduzido e a incapacidade de marcar alelos de interesse fizeram com que fossem substituídos por marcadores isoenzimáticos (proteínas) e de DNA (FERREIRA; GRATTAPLAGIA, 1998; RAMALHO et al., 2004).

Não obstante, as descrições morfológicas são ainda hoje o “cartão de apresentação” de uma nova variedade. Estes têm papel fundamental na divulgação das características agronômicas de novos materiais genéticos, e podem influenciar decisivamente na escolha de variedades por parte de agricultores e outros interessados. Contudo, as descrições morfológicas apresentam limitações, especialmente na distinção de genótipos elite. Em culturas de base genética estreita, eles podem muitas vezes não distinguir adequadamente cultivares comerciais (SMITH; SMITH, 1992; PECCHIONI et al., 1996). Algumas características morfológicas podem ter a desvantagem de serem influenciadas, em maior grau, por fatores ambientais, e podem não representar a real similaridade ou diferença entre os indivíduos. Por outro lado, marcadores de DNA representam estritamente a variação genética, não sofrendo influência ambiental (WEISING et al., 1995).

A avaliação da variabilidade genética de acessos presentes em um germoplasma vegetal depende da disponibilidade de marcadores polimórficos e neutros do ponto de vista do efeito ambiental. Neste sentido, avaliações de variabilidade genética em germoplasma de plantas realizam-se utilizando vários marcadores baseados na análise direta do DNA (HOSHINO et al., 2002) e em alguns casos, associado aos marcadores morfológicos (CUPIC et al., 2009; FABRI, 2009; FUAD et al., 2010). Importante de salientar, que apesar da diversidade de marcadores moleculares disponíveis, a sua (correta) escolha para um determinado estudo torna-se uma premissa fundamental. Segundo Anne (2006) três quesitos devem ser definidos na hora de se optar por um marcador: (i) a questão biológica tendo em vista o nível de variabilidade e a natureza da informação, (ii) escolha da região do DNA e (iii) escolha da técnica. Complementando, existe ainda a necessidade de escolher os programas computacionais específicos dentro da análise genética de populações como é o caso do presente estudo. Excoffier e Heckel (2006) apresentam uma revisão sobre os mais vinte programas computacionais usualmente empregues em genética de populações, alguns dos quais usados neste trabalho

Os marcadores moleculares são sequências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Dentre os vários tipos de marcadores existentes, os microssatélites apresentam a vantagem de serem codominantes, bastante informativos e de fácil utilização para muitas espécies vegetais. No entanto, procedimentos laboratoriais sistemáticos e

específicos fazem-se necessários para a otimização das sequências de primers que serão usadas. Somente desta forma, a simplicidade do uso deste marcador é atingida (BRONDANI et al, 2007). Também chamados de sequências simples repetidas (SSRs), os microssatélites consistem de curtas regiões do DNA com não mais do que seis nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* ao longo do genoma (LITT; LUTY, 1989; FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; HANCOCK, 2000). Estas regiões são amplificadas através de reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando um par de primers específicos (de 20 a 30 bases), complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Para a separação desses alelos, são utilizados géis de poliacrilamida ou agarose que possibilitam a separação dos alelos de diferentes tamanhos quando submetidos à eletroforese. E para a visualização desses alelos, são utilizados brometo de etídeo, nitrato de prata, radioisótopos ou a bioluminescência.

Os microssatélites estão presentes em regiões codantes e não codantes do genoma e são usualmente caracterizados pelo alto polimorfismo que é decorrente das altas taxas de mutação presente nesses locos. Diferentes hipóteses têm sido formuladas para explicar os mecanismos que levam às altas taxas de mutação que variam de loco para loco, sendo essa variação de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco por geração (SCHLÖTTERER, 2000). Dentre elas, podem ser citados: os erros que acontecem nos processos de recombinação, o *crossing-over* desigual e o processo de *slippage* da polimerase no processo de replicação ou reparo do DNA (STRAND et al., 1993).

Os SSR foram revisados por Zhu et al. (2000), Ellegren (2004), Oliveira et al. (2006), Grover & Sharma e Kalia et al. (2011) porém há muito que estes marcadores são usados na genética de plantas (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). O polimorfismo dos fragmentos obtidos é devido ao diferente número de repetições das sequências simples e tais informações se tornam importantes para estudos genéticos em plantas, animais e micro-organismos, inclusive em estudos de ecologia molecular (SELKOE; TOONEN, 2006).

Este tipo de marcador está substituindo rapidamente outros marcadores em diversos tipos de estudos genéticos, especialmente devido à sua reprodutibilidade e simplicidade na técnica, à pequena quantidade requerida de DNA, ao baixo custo, ao grande poder de resolução, e finalmente por constituírem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje. Além disso, parecem ter uma distribuição frequente e aleatória, permitindo uma cobertura ampla do genoma (CAIXETA et al., 2006). O desenvolvimento dos locos

microssatélites pode se basear no aproveitamento de primers desenvolvidos para outras espécies, os quais, devido à natureza conservada das sequências franqueadoras dos microssatélites, podem ser transferidos de um grupo para outro, conforme observado por Márquez-Lema et al. (2010) e Tang et al. (2010). Essa característica é denominada de transferibilidade ou amplificação heteróloga (KALIA et al., 2011).

O conhecimento de como a variação gênica está distribuída entre as populações pode ter importante implicação tanto na biologia evolutiva como na ecologia de conservação, já que as diferenças entre populações são muito usadas para se desenvolver estratégias de preservação de espécies (BALLOUX; MOULIN, 2002). Os locos microssatélites permitem o entendimento mais refinado de estruturas de população de planta (SLATKIN, 1995) e podem se tornar uma importante ferramenta para o entendimento e caracterização de germoplasma de várias espécies de inhame (MIGNOUNA et al., 2003; TOSTAIN et al., 2007; OBDIEGWU et al. 2009a,b). Resta salientar que o uso de marcadores microssatélites não é uma questão de modismo como alguns poderiam supor. Sua aplicabilidade em múltiplos campos de estudos, a atual facilidade de desenvolvimento de novos bancos enriquecidos de microssatélites, bem como outras vantagens já aqui citadas os têm popularizado notavelmente, sobretudo em áreas como a de genética de populações (SCHLÖTTERER, 2004).

2.7 Caracterização da diversidade genética por meio de marcadores moleculares em *Dioscorea alata*

A diversidade genética promove matéria prima para a adaptação das espécies, sendo também a base para o melhoramento genético. Ela é responsável por parte das diferenças de produtividade e reprodução entre os indivíduos de uma espécie (LOWE et al., 2005). Alguns trabalhos têm assinalado a importância da diversidade genética dentro do gênero *Dioscorea* e a grande maioria tem tentado compreender como e de que forma essa diversidade está estruturada em regiões tropicais.

Marcadores isoenzimáticos foram utilizados para estudos da diversidade genética em 269 cultivares de *D. alata* originários do sul do Pacífico, Ásia, África, Caribe e América do Sul (LEBOT et al., 1998), concluindo que muitas cultivares exibiam variações diversas, muito provavelmente devido ao processo de seleção humana. Segundo os autores, a existência de uma

variação gênica significativa é devida também a recombinações genéticas verificada nos padrões isoenzimáticos. Muito antes, o estudo realizado por Martin e Rhodes (1977) apontava que a classificação intra-específica de *D. alata* é problemática e as relações genéticas entre cultivares são difíceis de explicar.

No Brasil, os marcadores isoenzimáticos foram usados para o estudo da diversidade genética entre etnovariedades de *D. alata* do Vale do Ribeira (BRESSAN, 2005), constatando-se alta variabilidade genética mantida pelos agricultores desta região, sendo que esta variabilidade não se encontra estruturada no espaço. Já os marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA) foram utilizados para avaliar a variabilidade intra-específica em acessos de *D. alata* originários da Jamaica (ASEMOTA et al., 1996). A partir de marcadores RAPD, Munõz (2003) determinou que genótipos de *D. alata*, do banco de germoplasma do IIAP (Instituto de Investigación Agropecuária do Panamá), se separavam claramente dos genótipos do banco de germoplasma do CATIE (Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza-Catie). O marcador AFLP (amplified fragment length polymorphism) foi utilizado para avaliar a diversidade genética em *D. alata* e sua relação com outras nove espécies comestíveis de *Dioscorea* (MALAPA et al., 2005). Esse marcador também foi utilizado em estudos sobre a domesticação do gênero *Dioscorea* (SCARCELLI et al., 2006). Por sua vez, Egesi et al. (2006), utilizando esse marcador, demonstraram que, a partir de 53 acessos de *D. alata* na África ocidental e central, cada grupo formado era uma mistura de acessos de origem geográfica diferente, indicando que a geografia não teve um papel central na diferenciação da espécie.

Com relação aos marcadores microssatélites, já foram desenvolvidos primers de microssatélites para várias espécies de *Dioscorea* (TOSTAIN et al., 2006; HOCHU et al., 2006), inclusive para *D. alata* (TOSTAIN et al., 2006). Fundamentalmente, os SSR têm sido utilizados para estudos dos padrões de segregação desses marcadores e caracterização de acessos de várias espécies do gênero *Dioscorea*, tais como *D. praehensilis* (CHAIR et al., 2011), *D. tokoro* (TERAUCHI; KONUMA, 1994), *D. rotundata* (MIGNOUNA et al., 2003a; MIGNOUNA et al., 2003b; SCARCELLI et al., 2005; MIGNOUNA et al., 2005; OBIDIEGWU et al., 2009a), *D. trifida* (BOUSALEM et al., 2006) e *D. alata* (ARNAU et al., 2009; OBIDIEGWU et al., 2009b). Estes marcadores têm sido também alvo de estudos envolvendo a complexa discussão da ploidia da própria espécie *D. alata* (ARNAU et al., 2009; OBIDIEGWU et al., 2009b).

Vários estudos vêm relatando altas taxas de transferibilidade dos SSR em espécies pertencentes ao mesmo gênero (MORETZSOHN et al., 2004; HOSHINO et al., 2006; GIMENEZ et al., 2007). Tostain et al. (2006) obtiveram altas taxas no teste de transferibilidade entre *D. alata* e outras espécies do gênero *Dioscorea*. No entanto, a biblioteca enriquecida desenvolvida pelos autores não foi exclusiva para *D. alata*, tendo sido desenvolvidos cinco primers específicos para esta espécie, sendo que poucos indivíduos foram testados para a espécie *D. alata*. Desta forma, tornam-se pertinentes novos estudos que enfoquem a caracterização genética para a *D. alata* com um maior número de primers específicos.

Referências

- ABANG, M.M.; WINTER, S.; MIGNOUNA, H.D.; GREEN, K.R.; ASIEDU, R. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v.12, p.486–496, 2003.
- ABRAHAM, K. Occurrence of hexaploid males in *Dioscorea alata* L. **Euphytica**, Wageningen, v.99, p.5–7, 1998.
- ABRAHAM, K.; NAIR, P.G. Polyploidy and sterility in relation to sex in *Dioscorea alata* L. (Dioscoreaceae). **Genetica**, Dordrecht, v.83, p.93–97, 1991.
- ABRAMO, M.A. **Taioba, cará e inhame: o grande potencial inexplorado**. São Paulo: Editora Ícone, 1990. 80 p.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.27, p.617–631, 2008.
- ALTIERI, M.A; MERRICK, L.C. "In Situ Conservation of Crop Genetic Resources through Maintenance of Traditional Farming Systems", **Economic Botany**, New York, v.4, n.1, p.86- 96, 1987.
- ALLEN, B.J.; BOURKE, R.M.; HIDE, R.L. The sustainability of Papua New Guinea agricultural systems: the conceptual background. **Global Environmental Change**, Guildford, v.5, p.297-312, 1995.
- ALVERSON, H. The Wisdom of Tradition in the Development of Dry-Land Farming: Botswana, **Human Organization**, Washington, v.43, p.1-8, 1984.

AMEND, T.; BROWN, J.; KOTHARI, A.; PHILLIPS, A.; STOLTON, S. **Protected landscapes and agrobiodiversity values**. Heidelberg: IUCN & GTZ; Kasperek, Verlag, 2008. 144p. (Protected Landscapes and Seascapes, 1).

AMOROZO, M.C.M. Maintenance and management of agrobiodiversity in small-scale Agriculture. **Functional Ecosystems and Communities**, Middlesex, v.2, p.11-20, 2008.

AMUSA, N.A.; ADEGBITE, A.A.; MUHAMMED, S.; BAIYEWU, R.A. Yam diseases and its management in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v.2, p.497-502, 2003.

ANDRADE, G.P. **Diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea spp.*) em áreas produtoras do Nordeste do Brasil**. 2007. 88p. Tese (Tese de Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007.

ANNE, C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. **Genetica**, Dordrecht, v.127, p.101-120, 2006.

ARAÚJO, M.S. O início da panificação: a história do pão. In: ARAÚJO, M.S. **Falando de Panificação**. São Paulo: BT Consultores e Editores, 1994. n.2. 235p.

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

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

BACO, M.N.; BIAOU, G.; LESCURE, J.P. Complementarity between Geographical and Social Patterns in the Preservation of Yam (*Dioscorea sp.*) Diversity in Northern Benin. **Economic Botany**, New York, v.61, p.385-393, 2007.

BALBACH, A.; BOARIM, D.F.S. **As hortaliças na medicina natural**. São Paulo: Missionária, 1993. 436 p.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.155-165, 2002.

BARRAU, J. **Les plantes alimentaires de l'Océanie, origines, distribution et usages**. 1962. 275p. Thèse de (Doctorat) - Faculté des Sciences, Marseille, 1962.

BELLON, M.R. The dynamics of crop infraspecific diversity: a conceptual framework at the farmer level. **Economic Botany**, New York, v.50, p.26-39, 1996.

BERMEJO, H.; LEÓN, J. (Ed.). **Neglected crops: 1492 from a different perspective**. Rome: FAO, 1994. p. 303-332. (J.E. Plant Production and Protection Series, 26).

BOUSALEM, M.; DOUZERY, E.P.; FARGETTE, D. High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: a contribution to understanding potyvirus evolution. **Journal of General Virology**, London, v.81, p.243–255, 2000.

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.

BOUSALEM, M.; VIADER, V.; MARIAC, C.; GOMEZ, R.M.; HOCHU, I.; SANTONI, S.; DAVID, J. Evidence of diploidy in the wild Amerindian yam, a putative progenitor of the endangered species *Dioscorea trifida* (Dioscoreaceae). **Genome**, Ottawa, v.53, p.371–383, 2010.

BRESSAN, E.A. **Diversidade isoenzimática e morfológica de inhame (*Dioscorea* spp.) coletados em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira – SP**. 2005. 172p. Tese (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.; FELIPIIM, 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.

BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R.P.V. **Manual Prático para o Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites em Plantas**, 1ª Edição, EMBRAPA, 2007. 114p.

BRUSH, S.B. Protecting traditional agricultural knowledge. **Journal of Law and Policy**, Washington, v.17, p.59-109, 2005.

BURKILL, I.H. The organography and the evolution of the Dioscoreaceae, the family of the yams. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.56, n.367, p. 319-412, 1960.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p.9-68.

CARDOSO, M.O. **Hortaliças não-convencionais da Amazônia**. Brasília: Embrapa-Cpaa, 1997. 137p.

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

CARVALHO, P.C.L.; CARVALHO, R.L. Coleção de genótipos silvestres e cultivados de *Dioscorea*. In: QUEIRÓZ, M. A. DE; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Versão 1.0. Petrolina-PE:

Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em:<<http://www.cpatia.embrapa.br>>. Acesso em: 22 jan. 2007. 1999.

CASCUDO, L.C. **História da alimentação no Brasil**. Belo Horizonte: Itatiaia; São Paulo: EDUSP; v.1/2, 1983. 926 p.

CEREDA, M.P. Justificativa para padronização dos nomes vulgares de *Colocasia* e *Dioscorea* spp no Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA. 2002. p. 306-307.

CHANG, S.J.; LEE, Y.C.; LIU, S.Y.; CHANG, T.W. Chinese Yam (*Dioscorea alata* cv. Tainung No. 2) Feeding exhibited antioxidative effects in hyperhomocysteinemia rats. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v.52, p.1720-1725, 2004.

CHAÏR, H.; DUROY, P.O.; CUBRY, P.; SINSIN, B.; PHAM, J.L. Impact of past climatic and recent anthropogenic factors on wild yam genetic diversity. **Molecular Ecology**, Oxford, v.20, p.1612–1623, 2011.

CHAPIN, F.S.; ZAVALA, E.S.; EVINER, V.T.; ROSAMOND, L.N.; VITOUSEK, P.M.; REYNOLDS, H.L.; HOOPER, D.U.; LAVOREL, S.; SALA, O.E.; HOBIE, S.E.; MACK, M.M.; DIAZ, E.S. Consequences of changing Biodiversity. **Nature**, London, v.405, 234-242, 2000.

CLAY, J.W.; SAMPAIO, P.T.B.; CLEMENT, C.R. **Biodiversidade Amazônica**: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: INPA/SEBRAE, 2000. 409 p.

CLEMENT, C.R.; HIROSHI, N.; NODA, S.; URIZZI M.A.L.; GLEISSIMAR, C.S. Recursos frutícolas na várzea e na terra firme de onze comunidades rurais do alto Solimões, Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, Manaus, v.31, n.3, p.521-27, 2001.

CLEVELAND, D.; SOLERI, D.; SMITH, S. Do folk crop varieties have a role in sustainable agriculture? **BioScience**, Washington, v.44, p.740-751, 1994.

CONWAY, G.R. Agroecosystems Analysis. **Agricultural Administration**, London, v.20, p.31-55, 1985.

COOMES, O.T.; BAN, N. Cultivated plant species diversity in home gardens of an amazonian peasant village in northeastern Peru. **Economic Botany**, New York, v.58, n.3, p. 420–434, 2004.

CORRÊA, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 2, 4, 5, 6. 1978.

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

_____. Yams. *Dioscorea* spp. (Dioscoreaceae). In: SIMMONS, N.W. (Ed.) **Evolution of crop plants**. London:Longman Group, 1976. p.70-74.

CUPIC, T.; TUCAK, M.; POPOVIC, S.; BOLARIC, S.; GRLJUSIC, S.; KOZUMPLIK, V. Genetic diversity of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes assessed by pedigree, morphological and molecular data. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v.7, p.343-348, 2009.

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; ZOUNDJIHEKPON, J.; SANGARE, A.; ASIEDU, R.; QUIN, F.M. Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) complex in Benin Republic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.46, p.371–388, 1999.

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.

DIEGUES, A.C.S.; ARRUDA, R.S. **Saberes tradicionais e biodiversidade no Brasil**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 176p. 2001.

EDEN, M.J. Swidden cultivation in forest and savanna in lowland southwest Papua New Guinea. **Human Ecology**, New York, v.21, n.2, p.127-136, 1993.

_____. Crop diversity in tropical swidden cultivation: comparative data from Colombia and Papua New Guinea. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.20, p.127-136, 1988.

EGESI, C.N.; ONYEKAB, T.J.; ASIEDU, R. Severity of anthracnose and virus diseases of water yam (*Dioscorea alata* L.) in Nigeria I: Effects of yam genotype and date of planting. **Crop Protection**, Guildford, v.26, p.1259–1265, 2007.

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. **Genetics**, Austin, v.5, p.435-445, 2004.

ESSAD, S. Variation géographique des nombres chromosomiques de base et polyploïdie dans le genre *Dioscorea*, à propos du dénombrement des espèces *transversa* Brown, *pilosiuscula* Bert. et *trifida* L. **Agronomie**, Paris, v.4, p.611–617, 1984.

EXCOFFIER, L.; HECKEL, G. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. **Nature**, London, v.7, p.745-758, 2006.

FABRI, E.G. **Diversidade genética entre acessos de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.Lam.) avaliada através de marcadores microssatélites e descritores morfoagronômicos**. 2009. 172p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

- FAOSTAT. **FAOSTAT Database**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 17 de Jul. 2009.
- FARALDO, M.I.F.; SILVA, R.M.; ANDO, A.; MARTINS, P.S. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agricola**, Piracicaba v.57, n.3, p. 499-505, 2000.
- 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.
- FODULOVICÉ, K.S.; GRUBISIÉ, D.; CÚLAFIÉ, L.; MENKOVIÉ, N.; RISTICÉ, M. Diosgenin and phytosterols content in five callus lines of *Dioscorea balcanica*. **Plant Science**, Limerick, v.135, p.63–67, 1998.
- FRANKHAM, R. Genetics and extinction (review article). **Biological Conservation**, Beijing, v.126, p.131–140, 2005.
- FUAD, G.; SILVIO, S.; POJSKIC, N., KURTOVIC, M.; PEJIC, I. Genetic assessment of apple germplasm in Bosnia and Herzegovina using microsatellite and morphologic markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.126, p.164-171, 2010.
- GALLUZZI, G.; EYZAGUIRRE, P.; NEGRI, V. Home gardens: neglected hotspots of agro-biodiversity and cultural diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, v.19, p.3635–3654, 2010.
- GFUS, 2007. **Unidad de facilitación global para especies subutilizadas**, IPGRI. Disponível em: <http://www.underutilizedspecies.org/documents/PUBLICATIONS/gfu_spanish.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2010.
- GIMENEZ, M.A.; HOSHINO, A.A.; BARBOSA, A.V.G.; PALMIERI, D.A.; LOPES, C.R. Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). **BMC Plant Biology**, London, v. 7, p. 1-13, 2007.
- GREUTER, W.; BARROE, F.R.; BURDET, H.M.; CHALONER, W.G.; DEMOULIN, V.; HAWKSWORTH, D.L.; JORGENSEN, P.M.; NICOLXON, D.H.; SILVA, P.C.; TREHANE, P. International code of botanical nomenclature (Tokyo Code). Berlin: Koeltz Scientific Books. 1994. 91 p.
- GRIFFITH, J.J. Economia da conservação *in situ* de recursos genéticos florestais. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, v.35, p.85-92, 1987.
- GROVER, A.; SHARMA, P.C. Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution? **Current Science**, Bangalore, v.100, p.858-869, 2011.

- HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites**. Oxford: University Press, 2000. p.1-9.
- HARLAN, J.R. **Crops and Man**. 2nd ed. American Society of Agronomy. Madison, 1992. 284p.
- HASAN, S.M.Z.; NGADIN, A.A.; SHAH, R.M.; MOHAMAD, N. Morphological variability of greater yam (*Dioscorea alata* L.) in Malaysia. **Plant Genetic Resources: characterization and utilization**, Rome, v.61, p.52–61, 2008.
- HAWKES, J.R. **The diversity of crop plants**. Cambridge: Harvard University Press, 1983. 184p.
- HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.16, p.629–636, 2001.
- 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.
- HOLLINGSWORTH, P.M.; DAWSON, I.K.; GOODALL-COPESTAKE, W.P.; RICHARDSON, J.E.; WEBER, J.C.; SOTELO, M.C.; PENNINGTON, R.T. Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p.497–501, 2005.
- HOSHINO, A.A.; BRAVO, J.P.; ANGELICI, C.M.L.C.D.; BARBOSA, A.V.G.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Heterologous microsatellite primers pairs informative for whole genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 665-675, 2006.
- HOSHINO, A.A.; PALMIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; BARATA, T.E.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.29, p.146-150, 2002.
- JACKSON, L.E.; PASCUAL, U.; HODGKIN, T. Utilizing and conserving agrobiodiversity in agricultural landscapes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.121, p.196–210, 2007.
- JARVIS, D.I.; MYER, L.; KLEMICK, H.; GUARINO, L.; SMALE, M.; BROWN, A.H.D.; SADIKI, M.; STHAPIT, B.; HODGKIN, T. **A training guide for in situ conservation on-farm**. Version 1. Rome: IPGRI, 2000. 189p.
- JEAN, M.; CAPPADOCIA, M. In vitro tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and 'Florido' and *D. abyssinica* Hoch. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.26, p.147-152, 1991.
- 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**, Wageningen, v.177, p.177:309–334, 2011.
- 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.
- KENYON, L.; LEBAS, B.S.M.; SEAL, S.E. Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific Islands contain many novel badnaviruses: implications for international movement of yam germplasm. **Archives of Virology**, Vienna, v.153, p.877–889, 2008.
- KLEINMAN, P.J.A.; PIMENTEL, D.; BRYANT, R.B. The ecological sustainability of slash-and-burn agriculture. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.52, p.235–249, 1995.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v.19, p.707-713, 2005.
- KUMAR, B.M.; NAIR, P.K.R. The enigma of tropical homegardens. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v.61, p.135–152, 2004.
- LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids**. Wallingford, CABI, 2009. 440p. (Crop production science in horticulture series, 17).
- 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 characterization of yam (*Dioscorea alata* L.) tubers from Vanuatu. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.53, p.1199–1208, 2006.
- LEONEL, M. O uso do fogo: o manejo indígena e a piromania da monocultura. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.14, p.231-250, 2000.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.44, p.398-401, 1989.
- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 326p.
- MADEIRA, N.R.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; GIORDANO, L.B. Contribuição portuguesa à produção e ao consumo de hortaliças no Brasil: uma revisão histórica. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.26, p.428-432, 2008.

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**, Dordrecht, v.52, p.919-929, 2005.

MARCOS, J.; CORNET, D.; BUSSIÈRE, F.; SIERRA, J. Water yam (*Dioscorea alata* L.) growth and yield as affected by the planting date: Experiment and modelling. **European journal of agronomy**, Netherlands, v.34, p.247-256, 2011.

MÁRQUEZ-LEMA, A; VELASCO, L.; PÉREZ-VICH, B. Transferability, amplification quality, and genome specificity of microsatellites in *Brassica carinata* and related species. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.51, n.2, p.123–131, 2010.

MARTINS, P.S. Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos. In: VIEIRA, I.C.G.; SILVA, J.M.C.; OREN, D.C., D'INCAO, M.A. : **Diversidade biológica e cultural da Amazônia**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2001. 369-384p.

_____. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plants species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.66, p.219-224, 1994.

MARTIN, F.W; RHODES, A.M. Intra-specific classification of *Dioscorea alata*. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.54, p.1–13, 1977.

_____. **Yam production methods**. Washington: USDA Agricultural Research Service 1972. 72p. (Production Research-Report, 147).

MELO, P.C.T. Contribuições das hortaliças subutilizadas e/ou negligenciadas à gastronomia brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 47,2007. Porto Seguro, v.25, n.1, 2007. 1 CD-ROM.

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 DO TARO, 2., 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA. 2002. p. 215-238.

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**, Warwick, v.142, p.269-276, 2003a.

MIGNOUNA, H.D.; ABANG, M.M.; ONASANYA, A.; AGINDOTAN, B.; ASIEDU, R. Identification and potential use of RAPD markers linked to Yam mosaic virus resistance in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.140, p.163–169, 2002a.

MIGNOUNA, H.D.; ABANG, M.M.; WANYERA, N.W.; CHIKALEKE, V.A.; ASIEDU, R.; THOTTAPPILLY, G. PCR marker-based analysis of wild and cultivated yams (*Dioscorea* spp.) in Nigeria: genetic relationships and implications for ex situ conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.52, p.755–763, 2005.

MIGNOUNA, H.D.; MANK, R.A.; ELLIS, T.H.N.; BOSCH, N.; ASIEDU, R.; ABANG, M.M; PELEMAN, J. A genetic linkage map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.105, p.726–735, 2002b.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. MMA. Disponível em: <http://homolog-w.mma.gov.br/>
Acesso em: 17 de Jul. 2011

MNZAVA, N.M. Vegetable crop diversification and the place of traditional species in the tropics. In: GUARINO, L. (Ed.). **Traditional African vegetables. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. IPGRI INTERNATIONAL WORKSHOP ON GENETIC RESOURCES OF TRADITIONAL VEGETABLES IN AFRICA: CONSERVATION AND USE, 16., 1997. Nairobi, Kenya. **Proceedings...** 29-31 August 1995, ICRAF-HQ, Nairobi, Kenya. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources. 1997.

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

MONTEIRO, D.A.; PERESSIN, V.A. Cultura do inhame. In: CEREDA, M.P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p.511-518.

MORETZSOHN, M.C.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J.F.M.; FERREIRA, M.ME. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, London, v. 4, p.11, 2004.

MORGANTE, M.; OLIVEIRA, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

MOURA, R.M.; OLIVEIRA, I.S.; TORRES, G.R.C. Primeiro Assinalamento de *Scutellonema bradys* em *Dioscorea alata* no Brasil, Estabelecido no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.2, p. 211, 2006.

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

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, Costa Rica**. 2003. 93p. Tese (Mestrado em Educação Para el Desarrollo y la Conservación) - Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza-Catie. 2003.

NAIR, P.K.R. **An introduction to agroforestry**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. 499 p.

NARULA, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, P.S. Genetic fidelity of in vitro regenerants, encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera* L., a potential alternative source of diosgenin. **Biotechnology Letter**, Amsterdam, v.29, p.623–629, 2007.

NESHEIM, I.; DHILLON, S.S.; STOLEN, K. A. What happens to traditional knowledge and use of natural resources when people migrate? **Human Ecology**, New York, v.34, n.1, p.99-131, 2006.

NRC (National Research Council). **Managing global genetic resources: Agricultural crop issues and policies**. Washington: National Academy Press, 1993. 480p.

OBIDIEGWU, J.E.; ASIEDU, R.; ENE-OBONG, E.E.; MUONEKE, C.O.; KOLESNIKOVA-ALLEN, M. Genetic characterization of some water yam (*Dioscorea alata* L.) in West Africa with simple sequence repeats. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v.7, p.132-136, 2009a.

OBIDIEGWU, J.; RODRIGUEZ, E.; ENE-OBONG, E.; LOUREIRO, J.; MUONEKE, C.; SANTOS, C.; KOLESNIKOVA-ALLEN, M.; ASIEDU, R. Ploidy levels of *Dioscorea alata* L. germplasm determined by flow cytometry. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.57, p.351-356. 2009b.

OBIDIEGWU, J.E.; RODRIGUEZ, E.; ENE-OBONG, E. E.; LOUREIRO, J.; MUONEKE, C. O.; SANTOS, C.; KOLESNIKOVA-ALLEN, M.; ASIEDU, R. Estimation of the nuclear DNA content in some representative of genus *Dioscorea*. **Scientific Research and Essay**, Naiorobi, v.4, p.448-452, 2009c.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

PADULOSI, S.; HOESCHLE-ZELEDON, I. Underutilized plant species: what are they? **LEISA Magazine**, Amersfoort, v.20, n.1, 2004.

PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M., TERZI, V. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. **Journal of Genetics and Breeding**, Roma, v.50, n. 3, p.203-219, 1996.

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, 2002a, p.15-26.

_____. Dioscoreaceae e Araceae: aspecto taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO. 2002b. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA. 2002b. p.37-53.

PEDRALLI, G.; CARMO, C.A.; CEREDA, M.; PUIATTI, M. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p. 530-532, 2002.

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

PERONI, N.; HANAZAKI, N. Current and lost diversity of cultivated varieties, especially cassava, under swidden cultivation systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.92, p.171-183, 2002.

PINEDO-VASQUEZ, M.; PADOCH, C.; MCGRATH, D.; XIMENES, T. **Biodiversity as a product of smallholders' strategies for overcoming changes in their natural and social landscapes: a report prepared by the unu/plec Amazonia cluster**, 2000. (PLEC NEWS AND VIEWS, 15)

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.

PLUCKNETT, D.L.; SMITH, N.H.J.; WILLIAMS, J.T.; ANISHETTY, N.M. **Gene Banks and the World's Food**. Princeton: Princeton University Press, 1987. 480p.

PRETTY, J. **Regenerating agriculture**. Washington: World Resources Institute, 1995. 235p.

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

RACKER, C.; SPOONER, D.M. The Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data. **Crop Science**, Madison, v.42, p.1451-1458, 2002.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 3 ed. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2004. 472p.

RAMSER, J.; WEISING, K.; LOPEZ-PERALTA, C.; TERHALLE, W.; TERAUCHI, R.; KAHL G. Molecular marker based taxonomy and phylogeny of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* - *D. cayenensis*). **Genome**, Ottawa, v.40, p. 903-915, 1997.

RIDDLE, J.M. **Dioscorides on pharmacy and medicine**. Austin: University of Texas Press, 1985. 298p.

RILEY, C.K.; WHEATLEY, A.O.; ASEMOTA, H.N. Isolation and Characterization of Starches from eight *Dioscorea alata* cultivars grown in Jamaica. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.5, n. 17, p.1528-1536, 2006.

RITZINGER, C.H.S.P.; SANTOS FILHO, H.P.; ABREU, K.C.L.M.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. **Aspectos fitossanitários da cultura do inhame**. 2003. 39p. (Documentos EMBRAPA/SPI).

RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, M.; BORGES, M.; MENESES, S.; AGUILERA, N.; VÁZQUEZ, J.; INFANTE, Z.; FONSECA, M. *In vitro* conservation of *Dioscorea alata* L. germplasm by slow growth. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, n.133, p. 8-12, 2003.

ROYERO, M.; VARGAS, T.E.; OROPEZA, M. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (Ñame). **Interciencia**, Caracas, v.32, n.4, p.247-252, 2007.

SAMBATI, J.B.M.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. Folk taxonomy and evolutionary dynamics of cassava: a case study in Ubatuba, Brazil. **Economic Botany**, New York, v.55, p.93-105, 2001.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, p.70-84, 2000.

SANTOS, E.S. dos. **Aspectos básicos da cultura do inhame** (*Dioscorea* spp.). João Pessoa – PB: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158 p.

SAUTOUR, M.; MITAINE-OFFER, A.C.; LACAILLE-DUBOIS, M.A. The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroid saponins. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v.61, p.91-101, 2007.

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.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? **Nature**, London, p. 63-69, 2004.

_____. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, Berlin, v.109, p. 365-371, 2000.

SEAGRI. **Cultura do cará**. Disponível em:<<http://www.seagri.ba.gov.br/cara.htm>>. Acesso em: 28 nov 2008. 2002.

SEGARRA-MORAGUES, J.G.; IRIONDO, J.M.; CATALA, P. Genetic Fingerprinting of Germplasm Accessions as an Aid for Species Conservation: A case study with *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae), one of the most critically endangered Iberian plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.96, p. 1283-1292, 2005.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Oxford, v.9, p.615–629, 2006.

SIMMONS, C.S.; PERZ, S.; PEDLOWSKI, M.A.; SILVA, L.G.T. The changing dynamics of land conflict in the Brazilian Amazon: The rural-urban complex and its environmental implications. **Urban Ecosystems**, New York, v.6, p.99–121, 2002.

SIQUEIRA, M.V.B.M. Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.29, p.6-20, 2011.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; PINHEIRO, T.T.; BORGES A; VALLE, T.L.; ZATARIM, M.; VEASEY, E.A. Microsatellites polymorphism in cassava landraces from the Cerrado biome, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Biochemical Genetics**, New York, v.48, p.879-895, 2010.

SIQUEIRA, M.V.B.M; VEASEY, E.A. Raíces y tubérculos tropicales olvidados o subutilizados en Brasil. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, Bogotá, v.3, p.110-125, 2009.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; SILVA J.R.Q ; BRESSAN, E.A. ; BORGES, A. ; KAYO, P.; VEASEY, E.A. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.32, p.104-110, 2009.

SLATKIN, M.A. measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v.139, p.457-462, 1995.

SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, New York, v.47, p.85-140, 1992.

SPOONER, D.M.; NÚÑEZ, J.; TRUJILLO, G.; HERRERA, M.R.; GUZMAN, F.; GHISLAIN, M. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.104, n.49, p.19398–19403, 2007.

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, London, v.365, p.274-276, 1993.

SWIFT, M.J.; VANDERMEER, J.; RAMAKRISHNAN, P.S.; ANDERSON, J.M.; ONG, C.K.; HAWKINS, B. Biodiversity and agroecosystem function. In: MOONEY, H.A.; CUSHMAN, J.H., MEDINA, E, SALA, O.E.; SCHULZE, E.D. (Ed.). **Functional roles of biodiversity: agrobiodiversity and food security**. New York, 1996. p. 261-298.

TANG, D.Q.; LU, J.J.; FANG, W.; ZHANG S.; ZHOU M.B. Development, characterization and utilization of GenBank microsatellite markers in *Phyllostachys pubescens* and related species. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.25, p.299–311, 2010.

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

TOSTAIN, S.; AGBANGLA, C.; SCARCELLI, N.; MARIAC, C.; DAINOU, O.; BERTHAUD, J.; PHAM, J.L. Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. **Plant Genetic Resources**, Roma, v.5, p.71–81, 2007.

TREWAVAS, A.J. The Population/Biodiversity Paradox. Agricultural Efficiency to Save Wilderness. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.125, p. 174–179, 2001.

VAVILOV, N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Translated by K. Start. **Chronica Botanica**, New York, v.13, p.1-366, 1951.

VEASEY E.A.; BRESSAN, E.A.; SIQUEIRA, M.V.B.M.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BORGES, A.; PEREIRA, K.J.C.; RECCHIA, G.H. Molecular markers in the study of genetic diversity in: *Dioscorea* spp.: *in situ/on farm* conservation approaches. In: **Molecular Agrobiology**. Devarajan Thangadurai (Org), Bentham eBooks, 2011 (no prelo)

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.

VEASEY, E.A.; BORGES, A.; ROSA, M.S.; QUEIROZ, J.R.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Genetic diversity in Brazilian sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Solanales, Convolvulaceae) landraces assessed with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.31, p.725-733, 2008.

VEASEY, E.A.; SILVA, J.R.Q.; SILVA, M.S.; BORGES, A.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Phenology and morphological diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) landraces of the Vale do Ribeira. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.64, n.4, p.416-427, 2007.

VIANA, J.M.S.; CRUZ, C.D.; BARROS, E.G. **Genética**. fundamentos. Universidade Federal de Viçosa: Editora UFV. 2003. v.1. 438p.

VINNING, G. **Select markets for taro, sweet potato and yam**. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. 2003.103p.

WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B.; BIANCHETTI, L. de B.; VALLS, J.F.M. Coleta de germoplasma vegetal: relevância e conceitos básicos. In.: WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 778p.

- WANG, G; LIU, J.S.; LIN, B.B.; WANG, G.K.; LIU, J.K. Two New Furanoid Norditerpenes from *Dioscorea bulbifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.57, n.6, p.625-627, 2009.
- WEISING, K. **DNA fingerprint in plants and fungi**. New York: CRC Press, 1995. 322p.
- WHEATLEY, A. O.; AHMAD, M. H.; ASEMOTA H. N. Development of salt adaptation in vitro greater yam (*Dioscorea alata*) plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, New York, v.39, p.346–353, 2003.
- WILSON, J.E. **A practical guide to identifying yams: the main species of *Dioscorea* in the Pacific Island**. Western Samoa: Ireta Publications, 1988. 7p.
- WOOD, D.; LENNE J. M. The conservation of agrobiodiversity on-farm: questioning the emerging paradigm. **Biodiversity and Conservation**, London, v.6, p.109-129, 1997.
- WU, W.H.; LIU, L.Y.; CHUNG, C.J.; JOU, H.J.; WANG, T.A. Estrogenic effect of yam ingestion in healthy postmenopausal women. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v.24, n.4, p. 235-243, 2005.
- ZÁRATE, N.A.H.; VIEIRA, M.C.; MINUZZI, A. Brotação de seis tipos de mudas dos clones de inhame roxo e mimoso. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.4, p.699-704, 2002.
- ZEVEN, A.C. Landraces: A review of definitions and classifications. **Euphytica**, Wageningen, v.104, p.127–139, 1998.
- ZHU, Y.; STRASSMANN, J.E.; QUELLER, D.C.. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genetic Resource**, Cambridge, v.76, p.227-236, 2000.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1 Objetivos gerais

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a diversidade genética, por meio de marcadores microssatélites, de acessos da espécie *Dioscorea alata* coletados junto a comunidades tradicionais ou agricultores familiares de diferentes regiões do Brasil (Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste), além da comparação destes com acessos comerciais da espécie adquiridos em feiras e mercados municipais.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os agricultores que cultivam a espécie *D. alata* em termos sócio-econômicos e obter dados relacionados sobre os materiais cultivados, bem como apresentar um panorama do cultivo desta espécie e sua distribuição em diversas regiões do Brasil.
- Estabelecer um protocolo de extração de DNA, otimizando as condições das reações de PCR, e revelação dos produtos de amplificação por eletroforese em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata para a análise de marcadores microssatélites em *D. alata*.
- Desenvolver novos primers de microssatélites específicos para *D. alata*, pela metodologia de biblioteca enriquecida de DNA genômico.
- Caracterizar a diversidade genética utilizando marcadores microssatélites de acessos pertencentes à espécie *D. alata*, coletados em roças de agricultura tradicional e familiar de diversas regiões do Brasil.
- Avaliar de que forma a diversidade genética de *D. alata* encontra-se estruturada entre e dentro das diferentes regiões estudadas.
- Comparar essa caracterização genética de acessos de *D. alata* com os acessos comerciais desta espécie, obtidos em feiras e mercados dos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Ceará, bem como junto ao banco de germoplasma do Instituto Agrônomo (IAC).

3.3 Hipóteses

- Existe polimorfismo para os *primers* de SSR em *D. alata*.

- Há transferibilidade de *primers* desenvolvidos para *D. alata* para outras espécies de *Dioscorea*.
- A maior parte da variabilidade dos acessos locais se concentra dentro das regiões amostradas.
- Não existe estruturação geográfica entre os acessos locais.
- A maior diversidade genética é observada entre os acessos locais e a menor diversidade entre os acessos comerciais.

4 DIVERSIDADE SÓCIOAMBIENTAL DE AGRICULTORES QUE CULTIVAM INHAME (*DIOSCOREA ALATA* L.) EM AGROECOSSISTEMAS BRASILEIROS⁷

Resumo

Este estudo teve como objetivos apresentar um panorama do cultivo e distribuição da espécie *Dioscorea alata* em diversos agroecossistemas do Brasil. Para tanto, foram visitados 63 agricultores em diferentes municípios e comunidades, em quatro regiões do Brasil: Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste. Nas visitas foram coletados tubérculos de inhame, plantados em vasos em casa-de-vegetação e depois transferidos para o banco de germoplasma. Foram realizadas em campo entrevistas semi-estruturadas em que foram levantados dados sócio-econômicos, etnobotânicos, e sobre o manejo dessa espécie. A maioria dos entrevistados eram homens (86%), casados (81%), com filhos (92%), usando a aposentadoria e agricultura com renda (50%) e tendo a mão de obra familiar como principal auxílio no cultivo de inhame (72%). Com relação à distribuição, observou-se a ocorrência de *D. alata* nas quatro regiões amostradas. Grande diversidade de nomes populares foi observada para a espécie (21 referências), com diferenças na nomenclatura popular em função das diferentes regiões onde a mesma é cultivada. Todos os entrevistados do Nordeste chamam a espécie de “inhame”, sendo que os entrevistados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste de “cará”. A maioria dos agricultores cultiva inhame em roças (73%), no entanto a importância dos quintais (11%) foi observada em vários municípios. Verificou-se também que a maioria dos agricultores cultiva os inhames em consorciação (59%) com outras espécies com áreas de diversas dimensões e que a prática do pousio, apesar de estar desaparecendo, ainda é praticada por muitos dos entrevistados (41%). Os resultados obtidos neste estudo visaram fornecer dados mais concretos sobre a distribuição e a diversidade de cultivos dessa importante espécie do gênero *Dioscorea*.

Palavras-chave: Cará; Diversidade agroecológica; Etnobotânica; Agricultura sustentável; Conservação *in situ*

Abstract (adaptar o abstract)

This study aimed to provide an overview of the cultivation and distribution of *Dioscorea alata* in different agroecosystems of Brazil. Were visited 63 farmers in different municipalities and communities in four regions in Brazil: South, Southeast, Northeast and West-Center. In the visits we collected tubers of water yam, known as 'cará' in some regions and as 'inhame' in others, which were planted in pots in the green-house and then transferred to field. Semi-structured interviews were conducted to collect socio-economic, ethnobotanical, and management data of this crop. The majority of interviews were man (86%), married (81%), with sons (92%), using old age pension and agriculture as gains (50%) and the familiar work hand as the main support in the yam cultivation (72%). Regarding the species distribution, we observed the occurrence of *D. alata* in the four regions. Wide variety of vernacular names for the species was observed (21

⁷ Parte das informações deste capítulo gerou a seguinte publicação: (1) VEASEY et al., 2010.

references), with differences in popular nomenclature based on the different regions where it is cultivated. All the northeast interviews call the species “yam”, and the southeast, south and west-center call “cará”. Most farmers cultivate yam in swidden fields (73%), however the importance of the homegardens has been observed in several municipalities (11%). It was also found that most farmers cultivate yams in association with other species (59%) in different size areas and the slash and burn practices, although that are disappearing, still be using by many agriculturist (41%). The results of this study aimed to provide more concrete data on the distribution and diversity of this important crop species of the genus *Dioscorea*.

Keywords: Cará; Agroecology diversity; Ethnobotany; Sustainable agriculture; Conservation *in situ*

4.1 Introdução

O inhame (*Dioscorea* spp.), da classe Monocotiledônea, família Dioscoreaceae, é uma planta poliplóide e de propagação vegetativa, constituindo a alimentação básica para mais de 100 milhões de pessoas em todo mundo, sobretudo nos trópicos úmidos e sub-úmidos (LEBOT, 2009; FAO, 2009). O gênero *Dioscorea* é o maior gênero da família e apresenta cerca de 600 espécies (PEDRALI, 2002a).

Lebot (2009) cita as 10 espécies cultivadas do gênero de maior importância no mundo: *Dioscorea cayenensis*, *D. rotundata*, *D. bulbifera*, *D. alata*, *D. esculenta*, *D. opposita*, *D. nummularia*, *D. transversa* e *D. pentaphylla*. De todas as espécies citadas, as espécies cultivadas de maior importância mundial na alimentação humana são: *D. alata* e *D. cayenensis*- *D. rotundata*. No Brasil, também merecem destaque essas duas espécies citadas acima, mas com menor importância em nível comercial, encontram-se também cultivos das espécies *D. trifida*, *D. bulbifera* e *D. opposita* (MONTEIRO; PERESSIN, 2002).

A espécie *D. alata* é originária do sudeste asiático e apresenta túberas comestíveis, boa qualidade nutritiva e tornou-se a principal espécie comercial, sobretudo no sul e sudeste do Brasil. Algumas variedades são derivadas da variedade “Florida”, originária de Porto Rico e introduzida no Brasil na década de 50 pelo Instituto Agrônomo de Campinas. A variedade “Florida” atingiu os requisitos comerciais ao longo dos anos, apresentando túberas uniformes e fácil trato no campo. No entanto, suas qualidades culinárias não são tão apreciadas como as da variedade “Mimosa”, outrora cultivada extensivamente e hoje difícil de ser encontrada no mercado (MONTEIRO; PERESSIN, 2002).

Apesar do cultivo de inhame ser possível de uma forma extensiva, é junto aos pequenos agricultores que ele ganha destaque. As comunidades tradicionais e locais mantêm grande diversidade genética de raízes e tubérculos, devido à sua importância econômica e cultural (PERONI; HANAZAKI, 2002, BRUSH, 2005, AMOROZO, 2008). A rápida erosão genética em países produtores de inhame (DANSI et al., 1997), sobretudo pelo aumento das monoculturas e áreas de pastagens, a necessidade de resgate e preservação do conhecimento tradicional para orientar programas de conservação de germoplasma (JARVIS et al., 2000), associadas à grande distribuição da espécie no Brasil (CARMO, 2002), faz-nos crer que a espécie *D. alata*, à semelhança de outras culturas de roças tradicionais, merece uma maior atenção (SIQUEIRA; VEASEY, 2009).

Apesar de ser possível o cultivo das espécies de inhame em várias regiões do Brasil, é notória a falta de informação, especialmente relacionada à área cultivada, produtividade e tamanho das propriedades dedicadas à exploração dessa espécie (ZÁRATE, 2002).

O objetivo deste estudo foi ampliar o banco de germoplasma de inhame da ESALQ a partir de coletas de acessos locais/tradicionais e acessos comerciais de *D. alata* em sistemas de agricultura tradicional, familiar e sistemas de plantio comercial, caracterizando os agricultores que cultivam esta espécie em termos sócio-econômicos e obtendo dados relacionados ao manejo e à diversidade intervarietal dos materiais sob cultivo. Desta forma, pretendeu-se com este estudo apresentar um panorama do cultivo de *D. alata*, bem como da distribuição da espécie em diversas regiões do Brasil.

4.2 Material e métodos

Para este estudo foi visitado um total de 63 agricultores de 28 municípios e 46 comunidades, em quatro regiões do Brasil: Sul (10%), Sudeste (10%), Centro-Oeste (42%) e Nordeste (38%) (Figura 4). Diferentes grupos de entrevistadores foram previamente estabelecidos no sentido de uma maior representação de municípios e distintos agroecossistemas.

Na região Sul foram visitados agricultores de Santa Catarina (SC), nos municípios de Joinville, Itajaí e São Francisco do Sul (Tabela 1). O clima é classificado, segundo Köppen, como Cfa subtropical mesotérmico úmido com verão quente. A temperatura média anual situa-se entre 16 a 20° C e a precipitação média anual de 1.700 a 2.500 mm. A umidade relativa do ar é de 82 a 86% (BRAGA; GUELLRE, 1999). Estes municípios foram colonizados por alemães,

italianos e açorianos, e as principais culturas dessa região atualmente são o arroz irrigado, banana, batata, cana de açúcar, mandioca, milho e tomate (SANTOS, 2005).

A área da região Sudeste usada para análise apresenta clima úmido com temperaturas brandas (28°C), precipitações variando entre 1.500 e 4.000 mm e vegetação formada pela Floresta Ombrófila Densa Atlântica. Foram visitados agricultores no município de Ubatuba, bem como dois agricultores considerados grandes produtores nos municípios de Mogi Guaçu e Mogi Mirim (Tabela 1).

No Nordeste, predomina o clima semiárido, as chuvas são escassas e irregulares: chove menos de 600 mm anuais. As temperaturas são altas o ano todo, ficando em torno de 26°C. A caatinga é a vegetação típica desse tipo de clima. Foram visitados agricultores dos Estados da Paraíba (PB), nos municípios Alhandra, Caaporã, Mamanguapé, Marcação, Riachão, Rio Tinto, Santa Rita, Sapé e Sobrado; Pernambuco (PE), nos municípios Aliança, Bonito, Camucim de São Félix, Condado, Ferreiro, Goiânia, Igarassu, Itambé e São Joaquim dos Montes; Maranhão (MA), município de Pedreiras, e Piauí (PI), municípios Água Branca, Regeneração e Teresina (Tabela 2).

A região Centro-Oeste teve como principal referência o território da Baixada Cuiabana. Este é formado por 13 municípios ao redor da capital do Estado, Cuiabá, abrangendo uma área de 85.369,70 km². Apesar de grande parte dos municípios ter sido fundada a partir de 1950, a colonização da região data do ano de 1.700, com a fundação de Cuiabá. Posteriormente, todos os municípios do território seriam derivados de Cuiabá. A biodiversidade nas roças da Baixada Cuiabana resulta da interação entre os recursos genéticos existentes no local, o ambiente e as práticas culturais utilizadas pelos agricultores tradicionais. O conhecimento local e a cultura do inhame são considerados partes integrantes da agrobiodiversidade e, desta forma, as atividades realizadas pelos agricultores, na roça, mantem a biodiversidade em constante dinâmica. O cultivo da cultura do inhame e de todas as espécies cultivadas existentes na região colabora para a existência e manutenção de populações tradicionais e locais (FERREIRA, 2011). Nesta região foram visitados os municípios: Acorizal, Cuiabá, Jangada, Nossa Senhora do Livramento, Nobres, Poconé, Rosário Oeste e Santo Antonio do Leverger (Tabela 3).

Figura 4 - Locais de coleta de inhame (*Dioscorea alata*) em quatro regiões do Brasil: Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste

Tabela 1 - Municípios, comunidades, coordenadas geográficas, e número de agricultores entrevistados das regiões Sul e Sudeste que cultivam *Discorea alata*

Município	Comunidade	Latitude (S)	Longitude (O)	Nº
Ubatuba, SP	Sertão do Ingá	23°31'	45°14'	2
Ubatuba, SP	Rio Escuro	23°28'	45°08'	1
Ubatuba, SP	Sertão do Quina	23°32'	45°15'	1
Mogi Guaçu, SP	Itaqui	22°10'	47°00'	1
Mogi Mirim, SP	-	22°28'	47°00'	1
Joinville, SC	Pirabeiraba	26°09'	48°59'	1
Joinville, SC	Comunidade Quiriri	26°18'	48°50'	1
Joinville, SC	Pirabeiraba	26°09'	48°59'	1
Itajaí, SC	Laranjeiras	26°58'	48°48'	1
Itajaí, SC	São Roque	26°54'	48°45'	1
São Francisco do Sul, SC	Acaraí	26°15'	48°37'	1

Tabela 2 - Municípios, comunidades, coordenadas geográficas, e número de agricultores entrevistados da região Nordeste que cultivam *Dioscorea alata*

Município	Comunidade	Latitude (S)	Longitude (O)	Nº
Sapé, PB	Melancia	07°01'	35°11'	1
Alhandra, PB	Sítio Acáz de baixo	07°24'	34°54'	1
Alhandra, PB	Jussara	07°24'	34°53'	1
Alhandra, PB	Fazenda Vale verde	07°23'	34°54'	1
Alhandra, PB	Sítio Canaã	07°26'	35°11'	1
Rio Tinto, PB	Boa Vista	06°51'	35°04'	2
Mamanguape, PB	Monte Alegre	06°51'	35°07'	1
Sobrado, PB	Caruncú	07°11'	35°15'	1
Sobrado, PB	Sítio Anta dos Sonhos	07°10'	05°10'	1
Marcação, PB	Lagoa Grande	06°56'	35°01'	1
Caapora, PB	Sítio Capim de Cheiro	07°30'	34°57'	3
Aliança, PE	Sítio Laranjeira	07°36'	35°08'	1
Aliança, PE	Boa Vista	07°36'	05°14'	1
Condado, PE	Sítio Patrimônio	07°35'	35°04'	1
Bonito, PE	Fazenda Ferro	08°27'	35°45'	1
Bonito, PE	Sítio Mucurí	08°29'	35°43'	1
São Joaquim dos Montes, PE	Sítio Tamanduá	08°26'	35°47'	1
Pedreiras, MA	Canto do Buriti	08°48'	42°48'	1
Regeneração, PI	Chapada Grugel	06°14'	42°36'	1
Água Branca, PI	Cedro	05°43'	42°38'	1
Vila Irmã Dulce, PI	Vila Irmã Dulce	05°11'	42°46'	1

Tendo sido constatado o cultivo de *D. alata* e após terem recebido informações sobre os objetivos da pesquisa e uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

(ANEXO I), que é um documento exigido pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos, pelo qual esta pesquisa obteve a devida autorização para ser realizada, os agricultores foram entrevistados com o auxílio de entrevistas semi-estruturadas (ANEXO II), visando contemplar dois conjuntos de dados distintos, mas complementares: a) Caracterização sócio-econômica; b) Caracterização da(s) área(s) de cultivo e diversidade.

Para a caracterização sócio-econômica, foram anotados: o nome do(a) agricultor(a) principal; comunidade; idade; sexo; estado civil; número de filhos; local de nascimento; tempo de residência no local; relação com a terra (se proprietário, posseiro, ou outros); fonte de renda (agricultura, aposentadoria e/ou outros); área total da propriedade; e quem são os trabalhadores na propriedade (familiares e/ou não-familiares).

Tabela 3 - Municípios, comunidades, coordenadas geográficas, e número de entrevistados da região Centro-Oeste que cultivam *Dioscorea alata*

Município-Estado	Comunidade	Latitude (S)	Longitude (O)	Nº
Cuiabá, MT	Rio dos Couros	15°36'	55°48'	4
Cuiabá, MT	P.A 21 de Abril	15°07'	55°48'	2
Cuiabá, MT	São Gerônimo	15°29'	55°54'	2
Cuiabá, MT	Rio dos Couros	15°35'	55°48'	2
Cuiabá, MT	P.A Bela Vista	15°22'	55°48'	1
Cuiabá, MT	Raizama	15°40'	55°46'	1
St. Ant. do Leverger, MT	Praia do Poço	15°54'	56°02'	1
St. Ant. do Leverger, MT	Valo verde	15°48'	56°07'	2
St. Ant. do Leverger, MT	Barreirinho	15°48'	56°01'	1
St. Ant. do Leverger, MT	Alto do Leverger	15°50'	56°04'	1
St. Ant. do Leverger, MT	Engenho Velho	15°48'	56°01'	1
Poconé, MT	Córrego Fundo	16°13'	56°37'	1
N. S. Livramento, MT	P.A Aterrado	14°51'	56°23'	2
Nobres, MT	Sela Dourada	14°43'	56°15'	1
Rosário Oeste, MT	Timbozal	14°51'	56°23'	1
Rosário Oeste, MT	Barranco Alto	14°51'	56°21'	1
Jangada, MT	Santo Antonio do Barreiro	15°25'	56°37'	2
Jangada, MT	P.A. Canoa Furada	15°18'	56°33'	1

Para a caracterização do manejo, da diversidade e das áreas de cultivo da espécie foram levantados: tamanho total da área da propriedade; tamanho da área do cultivo de inhame; se este é realizado em roças ou quintais (ou em ambos); disposição das variedades de inhame, i.e., se plantadas em consórcio com outras espécies ou separadamente; nome popular dado às variedades por eles cultivadas; a origem da nomenclatura local para a variedade cultivada; a origem da variedade; época de plantio; modo de uso (consumo); se já foi observado florescimento e/ou frutificação em alguma variedade; uso de insumos; e uso de máquinas agrícolas na propriedade.

Os dados das entrevistas semi-estruturadas, aliados à posterior identificação e coleta botânica de cada variedade (ANEXO III), foram analisados pelo método de estatística descritiva.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização sócio-econômica de agricultores que plantam *Dioscorea alata*

Dos 63 entrevistados, 86% foram homens e 14% mulheres. A média etária foi de 56 anos, variando de 23 a 85 anos. Em quase 100% dos casos, o agricultor nasceu na região onde foi realizada a entrevista e nela se estabeleceu. Em apenas um caso verificou-se um agricultor que tinha origem nordestina e se fixou na região Sudeste.

Com relação ao estado civil dos entrevistados, a maioria se apresentou como casado (81%) (Figura 5). Na região Nordeste, dos 24 entrevistados, apenas dois declararam serem solteiros. Para a região Sul e Sudeste, dos 12 entrevistados apenas um declarou-se solteiro e para a região Centro-Oeste, dos 24 entrevistados, nenhum se declarou solteiro. Dos 22 casais declarados na região Nordeste, apenas dois entrevistados tinham menos de 30 anos de idade. Na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste todos os entrevistados casados tinham mais de 30 anos de idade. Podemos entender por esses números que a escassez de jovens casais agricultores, nas regiões amostradas, é um fator a ter em conta quando se é discutido o envelhecimento da população rural. O êxodo predominantemente jovem mostra que o campo se abre cada vez mais para o contato com as cidades. Resta saber se esta abertura dará lugar a laços construtivos e interativos ou se levará à desagregação do tecido social existente hoje no meio rural (CAMARANO; ABRAMOVAY, 1999). Pesquisas recentes que abordam a migração juvenil do campo apontam para uma maior propensão à evasão feminina o que causa o desgaste do tecido social do meio rural que, além de

envelhecer, se masculiniza (ABRAMOVAY et al., 1998; CAMARANO; ABRAMOVAY, 1999; WEISHEIMER, 2004). No presente estudo, pelas entrevistas semi-estruturadas, não registramos esse tipo de fenômeno, no entanto, ressalva-se que o estudo não teve esse enfoque e que uma análise mais detalhada faz-se necessária.

Figura 5 - Dados relativos ao estado civil dos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata*

Quanto ao número de filhos, para o total dos entrevistados 34% declararam ter de um a dois filhos e 39% três a cinco filhos (Figura 6). No entanto, também foi observada a existência de agricultores sem filhos (8%) bem como agricultores com mais de 10 filhos (6%). Para Carneiro (2001) e Spanevello (2008) a reprodução da agricultura familiar ocorre de forma endógena, sendo um dos integrantes da família, tradicionalmente, o sucessor da unidade produtiva. Assim, a disposição dos jovens filhos de agricultores familiares em suceder aos pais está associada à própria continuidade da agricultura familiar como um todo. Para Sundersus (2008), a importância da agricultura familiar é focalizada na produção de alimentos, na geração de empregos e na distribuição de renda e terra. Todo agricultor e sua família, segundo o mesmo autor, tem em seu conjunto, práticas e técnicas coerentes com a sua realidade e finalidade do seu sistema de produção, uso do solo e com as suas necessidades essenciais, que compatibilizam os objetivos familiares com o meio ambiente.

Figura 6 - Dados relativos ao número de filhos dos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata*

Quanto à fonte de renda dos entrevistados, 50% declararam que vivem da aposentadoria e agricultura, e raros foram os casos (3%) em que agricultores manifestaram que sua fonte provinha apenas da aposentadoria (Figura 7). Observou-se que a renda previdenciária é muito importante para grande parte das unidades familiares e a agricultura torna-se um suplemento à baixa renda que muitos afirmam receber. Para Augusto e Ribeiro (2005) existe um número cada vez maior de aposentadorias rurais por idade, o que permite evidenciar o envelhecimento da população rural e uma melhor redistribuição de renda nos domicílios desses idosos. O campo, que no passado dependia basicamente da renda advinda da produção agrícola, sujeita às intempéries, conta com mais esta alternativa de renda, razão pela qual o fenômeno de envelhecimento da população brasileira, especificamente no ambiente rural, denota a necessidade de políticas ajustadas ao setor, para que a concessão destes benefícios previdenciários não seja ameaçada no futuro.

Figura 7 - Dados relativos à fonte de renda dos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata*

Observou-se que a mão de obra disponível para as atividades produtivas das unidades familiares não é numerosa. Para o conjunto de agricultores entrevistados, 72% dependem da mão de obra familiar, 17% utilizam mão de obra familiar e não familiar, e apenas 11% utilizam mão de obra não familiar (Figura 8). Para Juliatti et al. (2002) uma das grandes forças impulsionadoras à exploração sustentável no plantio de inhame (com ênfase na região de Espírito Santo) é o uso de mão de obra familiar, ao mesmo tempo em que ocorre a necessidade de profissionalização dessa mão de obra rural usada nas explorações. A cultura de inhame é grande empregadora de mão de obra em várias regiões do Brasil (com maior ênfase no nordeste), ocupando 1,25 homem/hectare/ano, de grande importância social, já que é uma produção tipicamente familiar (SANTOS, 2002). Segundo Guarrido et al. (2003), na região do Recôncavo Baiano, estudos realizados por Mendes et al. (2003) constataram que a maioria dos cultivos de inhame são regidos por pequenos produtores familiares, policultores, que têm na lavoura a complementação de sua renda. Para inúmeros autores (PINHEIRO, 2004; GLIESSMAN, 2005), novos caminhos têm sido apontados para um desenvolvimento rural ecologicamente sustentável, socialmente justo e economicamente viável, com a opção pela agricultura familiar.

Figura 8 - Dados relativos à mão de obra usada pelos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata*

Perante a caracterização sócio-econômica de agricultores gerada neste estudo, e segundo a análise de alguns autores (DE ANJOS; CALDAS, 2005), pode-se inferir que o meio rural nos dias atuais não apresenta atrativos para a permanência dos jovens no campo, seja pela falta de atividades que proporcionem uma renda atrativa; falta de entretenimentos; dificuldades para o acesso do ensino escolar; ou pela insatisfação com o rendimento obtido na agricultura. A penosidade e a imagem negativa do trabalho agrícola e falta de lazer, colaboram para que o meio rural não apresente atrativos para a permanência dos jovens e em consequência teremos o envelhecimento e a masculinização do meio rural em todo o Brasil (GODOY et al., 2010).

A caracterização realizada neste trabalho tende a retratar parte de uma população rural que se dedica ao cultivo de inhame, mas devido à grande extensão territorial do país, inúmeras comunidades locais/tradicionais (indígenas ou não), ficaram de fora. A grande miscigenação verificada nas comunidades brasileiras, mas igualmente das práticas agrícolas que estas têm adotado ao longo dos anos, faz com que o inhame se torne um interessante cultivo a ser estudado. A adição de novos perfis agrícolas certamente enriqueceria os resultados aqui apresentados.

4.3.2 Caracterização das áreas de cultivo e uso de nomes populares para *Dioscorea alata*

Do total de agricultores entrevistados, a maior parte (73%) cultiva as espécies de inhame em roças, enquanto que 14% utilizam tanto as roças como os quintais (Figura 9). O restante, 11% dos agricultores, cultivam somente em quintais. Observa-se que o espaço da roça é de fundamental importância para a conservação das espécies em questão, principalmente para as comunidades locais. As roças observadas nas diversas áreas do estudo configuram-se como sistema de coivara, no entanto, adaptações foram surgindo ao longo dos anos. Tanto o ambiente como os agricultores moldaram os diversos tipos de agroecossistemas (OLIVEIRA, 1994; MARTINS; OLIVEIRA, 2009). Apesar do manejo de roça ainda ser prática comum, há também uma expressiva manutenção dos quintais por parte de muitas comunidades locais e tradicionais. Os quintais são espaços em geral pequenos, situados próximos às residências, cultivados e mantidos pela mão de obra familiar. Na maioria dos casos, tornam-se um reduto de diversidade quando o agricultor é impossibilitado de manter seus cultivos em roças. Uma alta diversidade de espécies, com múltiplas finalidades, que coexiste com pequenos animais domésticos e/ou silvestres, é mantida nesses quintais, sobretudo olerícolas para fins de subsistência (SMITH, 1996; MILLER; NAIR, 2006; GALLUZZI et al., 2010).

Figura 9 - Dados relativos ao tipo da área plantada pelos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata*

Com relação ao tamanho da área de cultivo para *D. alata*, foi difícil em alguns casos obter uma informação consistente, sobretudo na região Sudeste onde é proibida a abertura de roças em áreas de conservação ambiental, e onde muitos agricultores (12%) afirmam desconhecer a dimensão da área de cultivo (Figura 10). Este é um problema também enfrentado por comunidades tradicionais de Uganda, na África, onde muitos dos habitantes vem suas áreas confiscadas/controladas pelo governo (BYARUGABA et al., 2006). No entanto, constatamos que nas quatro regiões amostradas, a dimensão das áreas de cultivo da espécie era variável, isto é, nenhuma região apontou para um tamanho de área específica, mostrando que este item analisado é bastante diversificado.

Figura 10 - Dados relativos ao tamanho da área plantada pelos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata*

No Nordeste, o tamanho das áreas de cultivo variou desde 200 m² até áreas com mais de 2 ha, como nos municípios de Alhandra, PB (4 e 25 ha), Sobrado, PB (5 ha), Caapora, PB (3 e 5 ha), Pedreiras, MA (3 ha), Bonito, PE (10 ha) e São Joaquim dos Montes, PE (30 ha). A área média destinada ao plantio de inhame na região Nordeste foi de 4 ha. A média de área para o cultivo de inhame no Sul e Sudeste foi de 40,9 ha. No entanto, esse valor não traduz a realidade já que, por observação de campo, a maioria dessas roças não passava de 5 ha. Na região amostrada do Sudeste, apenas um agricultor em Ubatuba, SP, relatou o plantio em grande escala, com 59 ha. No entanto, no município de Mogi Guaçu, SP, foi entrevistado um agricultor de grande escala, que

cultiva a cultivar Florida, sendo que a maior parte da propriedade é utilizada para o plantio (aproximadamente 142 ha), que posteriormente é comercializada junto ao CEASA em São Paulo. Foi entrevistado outro agricultor que também cultivava a espécie para fins comerciais, no município vizinho, em Mogi Mirim, SP, mas neste caso em área bem mais reduzida, de 1,5 ha, sendo que a área total de sua propriedade é de 23 ha. Este agricultor não soube definir o nome da variedade que usa, denominando-a simplesmente de “cará”.

Na região amostrada do Centro-Oeste, cujo tamanho das propriedades variou de 2 a 81 ha, não foi possível saber com exatidão o tamanho destinado para o cultivo da espécie, uma vez que os agricultores citaram esta informação pelo número de “tumbas”⁸, que variou de poucas unidades a aproximadamente 220 tumbas. Observou-se que 41% destes agricultores cultivam o inhame em uma área com mais de 10 “tumbas”.

Verifica-se, portanto, que nas diferentes regiões amostradas, tanto no Nordeste, no Sul, Sudeste e no Centro-Oeste, há agricultores que cultivam a espécie para fins comerciais e não apenas para subsistência. No entanto, para a maioria dos entrevistados, os produtos obtidos com a prática agrícola servem apenas para complementação na dieta alimentar da família visto que além de serem pouco tecnificados, a grande maioria das áreas é de tamanho reduzido. Um estudo realizado no Estado de Alagoas (o terceiro maior produtor de inhame do país) indicou que o desmatamento (tanto por ocupação urbana como por fazendas) é a principal causa (com 56%) que pode gerar o fim da exploração da lavoura do inhame nas áreas atuais de cultivos (ROCHA JUNIOR et al., 2003). Apesar de Alagoas não fazer parte das nossas análises, a questão da terra é um tema comumente retratado nos agricultores dos demais Estados. A destruição (falta de cuidados com a terra por desconhecimento técnico) e a falta de terras cultiváveis ou próprias somam 33% das razões para o abandono do inhame nos próximos 30 anos, segundo o estudo de Rocha Junior et al. (2003). Para a grande maioria dos entrevistados não será mais possível explorar as atuais áreas de plantio da cultura (normalmente de pequena e média escala, muitas delas em sistema de policultivo), devido às condições atuais de exploração, que não são sustentáveis (tanto para o pequeno agricultor como para o meio ambiente), observando-se cada vez mais a monocultura altamente tecnificada. O papel dos técnicos extensionistas na mudança

⁸ Esta forma de plantio é muito comum na agricultura tradicional, onde consiste em reunir o solo em pequenos montes. Na África, para esta prática, são utilizadas largas enxadas. O tamanho de cada monte, a distância média entre estes e o número de plantas de inhame pode variar, ou seja, quanto maior o monte, maior a distância entre estes (OKOLI; ONWUEME, 1986). O termo matumbo é encontrado na literatura e refere-se a mesma prática de cultivo (SANTOS, 1996).

dessa perspectiva seria o de orientar os agricultores de pequeno e médio porte em técnicas de produção agrosustentáveis que, além de promoverem a melhoria na produtividade de inhame, estivessem aliadas com a contínua preocupação na preservação do meio ambiente e da biodiversidade das hortaliças. Aparentemente poderia se pensar numa contradição de valores, no entanto, entender a dinâmica de sistemas agrícolas embasados num sistema de agrobiodiversidade, requer um conhecimento integrado associado aos aspectos biológicos e socioculturais da região. Para que ações sejam tomadas e bons resultados sejam obtidos, uma visão operacional faz-se necessário, desde o ponto de vista local até o regional (AMOROZO, 2008; ENFALBERT et al., 2011).

Relatos dos agricultores sublinham que antigamente o “pousio” (descanso ou repouso dado às terras cultiváveis, variando esse descanso de um a três anos, interrompendo-se as culturas para tornar o solo mais fértil) era prática corrente, sendo que atualmente a prática tem perdido adeptos, seja pela questão de mão de obra, seja por outros fatores associados a políticas de conservação ambiental ou pelas dificuldades da própria agricultura tradicional e familiar. Verificou-se durante as entrevistas que alguns agricultores preferiam não revelar a prática, já que em alguns casos ela se encontra associada a abertura de roças⁹. No entanto, uma significativa parcela dos entrevistados das regiões Nordeste, Sul e Sudeste (41% do total de agricultores) (Figura 11), ainda efetua o pousio da cultura por períodos que variam em conformidade com diferentes áreas que o agricultor possui. Não foi possível estabelecer um período de pousio nas diferentes regiões, no entanto, pelos relatos registrados, esse tempo tem-se tornado flexível e cada vez menor, muito em função da restrição de abertura em novas áreas, como pela urgência de produzir túberas (conjuntamente com outras culturas) para o mercado local. É sabido que o pousio trás muitas vantagens ao agricultor, especialmente ao solo, tornando-o livre de alguns patógenos, além de permitir ao solo melhorar a sua capacitação de retenção de água em regiões secas (GLIESSMAN, 2005).

⁹ A prática de queima e corte de vegetação nativa sem prévia autorização das entidades competentes é considerada crime ambiental. Estando amplamente comprovados os danos ambientais praticados em vegetação que compoem a Mata Atlântica, elevada à categoria de patrimônio nacional pelo art. 225, § 4º, da CF, mediante o corte e a queimada da área, impõe-se o dever de recompor os prejuízos havidos e prevenir novas condutas.. Para mais detalhes ver em Resende (2002) e Bressan (2005).

Figura 11 - Dados relativos à realização de pousio pelos entrevistados que cultivam *Dioscorea alata*

Os agricultores das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste reconhecem os tubérculos comestíveis de *D. alata* pela nomenclatura geral de “cará”, enquanto que na região do Nordeste, esta espécie é popularmente conhecida como “inhame”. Dentro destes dois termos muita variação pôde ser observada, tendo sido levantado um total de 21 nomes populares atribuídos aos acessos locais de inhame (*D. alata*), com a maior porcentagem de citação para o nome “inhame São Tomé” (31%), seguido de “cará roxo” (16%), “cará branco” (14%), e simplesmente “cará” (13%) (Tabela 4).

No entanto, observou-se uma grande regionalização na atribuição dos nomes populares, o que significa que a nomenclatura varia de acordo com a região onde a espécie é cultivada. Na região Nordeste a espécie é conhecida em sua grande maioria (79% do total de acessos levantados no NE) como “inhame São Tomé”, tendo sido citada desta forma por 13 agricultores da Paraíba e seis de Pernambuco (Tabela 4), embora seja também conhecida na região como “inhame branco”, “inhame roxo”, “inhame mandioca”, “inhame de Pernambuco”, “inhame babão” e “inhame roxo bolota”.

Tabela 4 - Número de agricultores por Estado para cada variedade citada de *Dioscorea alata* e o valor total (%) para as citações em cada variedade

Variedade	PE	PB	MA	PI	SP	SC	MT	TOTAL (%)
Inhame São Tomé	6	13	-	-	-	-	-	31
Inhame branco	-	-	-	3	-	-	-	5
Inhame roxo	-	-	1	1	-	-	-	5
Inhame roxo bolota	-	-	-	1	-	-	-	1
Inhame babão	1	-	-	-	-	-	-	1
Inhame mandioca	-	-	-	1	-	-	-	1
Inhame de PE	-	-	1	-	-	-	-	1
Cará roxo	-	-	-	-	1	-	8	16
Cará branco	-	-	-	-	3	-	6	14
Cará	-	-	-	-	1	1	6	13
Cará lavanca	-	-	-	-	-	-	3	5
Cará pão branco	-	-	-	-	-	2	-	3
Cará pão roxo	-	-	-	-	-	3	-	5
Cará arroba	-	-	-	-	-	-	2	3
Cará pão	-	-	-	-	-	1	-	1
Cará pele roxa	-	-	-	-	-	-	1	1
Cará canga ou cenoura	-	-	-	-	-	-	1	1
Cará cipó	-	-	-	-	-	-	1	1
Cará pé de cavalo	-	-	-	-	1	-	-	1
Cará manchado	-	-	-	-	-	-	1	1
Florida	-	-	-	-	1	-	-	1

Na região Sul, nos municípios de Itajaí, Joinville e São Francisco do Sul, em Santa Catarina, a espécie é conhecida principalmente como “cará pão” (86% do total de variedades citadas nesta região), incluindo variações do nome como “cará pão roxo” (3%) e “cará pão branco” (5%). O restante dos agricultores entrevistados denominou a espécie simplesmente como “cará” (13%). A origem do nome “cará pão”, segundo relato dos agricultores, remonta à época da segunda guerra mundial, que em virtude da escassez de trigo, utilizavam-se na região os tubérculos de *D. alata* para a fabricação de pão.

Na região Sudeste, mais especificamente no município de Ubatuba, SP, os termos encontrados variaram entre “cará branco” (14%), “cará roxo” (16%) e “cará pé de cavalo” (1%), enquanto que os agricultores que a cultivam para fins comerciais nos municípios de Mogi Guaçu e Mogi Mirim, a denominam de “Florida” ou simplesmente “cará”. No litoral sul do Estado de São Paulo, na região do Vale do Ribeira, esta espécie é conhecida também por “cará guaçu” (variando de cará guaçu roxo ou branco), “cará São João” (em função da sua colheita na época das festas de

São João), “cará aipim”, “cará bolo” e “cará coco” (Bressan et al., 2005). A riqueza de dados encontradas por Bressan et al. (2005) deveu-se pelo estudo focar uma pequena região onde a prática de agricultura tradicional/local é corrente. Não obstante, e a partir dos dados levantados, observa-se que existe grande regionalização dentro do mesmo Estado, com diferentes nomenclaturas para a espécie quando comparadas as regiões litorâneas norte e sul do Estado de São Paulo. À semelhança de outras culturas de propagação vegetativa, o inhame é cultivado e mantido por agricultores a partir de características agrobotânicas, taxonômicas ou gastronômicas, e devido a essas características, diversos nomes são atribuídos às variedades que vão surgindo (CHAÏR et al., 2010). Alguns autores (ASEMOTA et al., 1996; DANSI et al., 1999; PEDRALLI et al., 2002), observaram uma variação considerável em termos linguísticos na nomenclatura das variedades de inhame, na qual cada local tem sua própria variação de nomes para diferentes cultivares.

Na região Centro-Oeste, no Estado do Mato Grosso, verificou-se grande diversidade de nomes vernaculares atribuídos à espécie, registrados como “cará roxo” (30%, com relação ao total desta região), “cará branco” (6%), “cará” (13%), “cará lavanca” (5%), “cará arroba” (3%), entre outros com menores citações (Tabela 4). Um levantamento realizado por Ferreira et al. (2010) e Ferreira (2011) no Estado de Mato Grosso observou que os nomes populares estão ligados com a classificação e identificação feita pelos agricultores para cada espécie (*D. alata* e *D. trifida*) de acordo com cada região. Os autores acreditam que a riqueza de nomes vernaculares nesse Estado deve-se à forma como os próprios municípios foram colonizados. Muitas destas áreas não têm a cultura do inhame na sua raiz, e possivelmente importaram não só os nomes como os próprios tubérculos de estados vizinhos. A história de ocupação do Mato Grosso, e nomeadamente das regiões de estudo é complexa. As diferentes comunidades indígenas que habitavam a região foram substituídas pelos bandeirantes, e seguidamente por garimpeiros vindos de várias regiões do Brasil. O comportamento demográfico dos vários sub-espacos do estado, refletem as diferenças regionais em termos do processo de ocupação econômica e momentos da ocupação da fronteira agrícola (CAVALCANTE, 2006; CUNHA, 2006) e acredita-se que naturalmente ilustram a diversidade de cultivos e nomes vernaculares nos municípios do estado.

Com relação ao número de variedades desta espécie, a maioria dos agricultores (85%) cultiva apenas uma variedade. Observou-se que no Nordeste, apenas os poucos agricultores visitados dos Estados do Piauí e Maranhão cultivam de duas a três variedades. Nos Estados de

Pernambuco e Paraíba, apenas uma variedade é cultivada pelos agricultores. Em Santa Catarina, de seis agricultores que cultivavam a espécie, dois cultivam mais de uma variedade, e em Ubatuba, SP, apenas um agricultor citou a presença de duas variedades em suas roças. Esta é uma constatação que difere, por exemplo, da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), onde normalmente os agricultores cultivam mais de uma variedade em suas roças (AMOROZO, 2000; SAMBATTI et al., 2001; EMPERAIRE; PERONI, 2007).

Quando questionados quanto à origem dos acessos de inhame, a grande maioria afirmou desconhecer de onde provinha a “variedade”. Outros inqueridos afirmaram terem recebido de vizinhos, ou que tinham comprado no mercado, ou que o cará/inhame já estava lá quando começaram a trabalhar a terra. Outra referência importante sobre esse questão foi relativamente aos pais (ou familiares próximos) que já possuíam essas “variedades”, e que depois de velhos ou mortos, os entrevistados e agora donos da terra, resolveram manter a tradição de cultivo da geração anterior.

A totalidade dos agricultores planta a espécie de forma vegetativa e foi relatada em 68,8% dos casos, a observação da ocorrência de florescimento, mas nenhuma referência à frutificação. Monteiro e Peressin (2002) afirmam que o florescimento no Brasil é raro. Lebot (2009) refere que infelizmente, e na maior parte dos casos, as variedades que apresentam as melhores características, sejam elas agronômicas (túberas compactas, por exemplo) ou de palatibilidade, são aquelas que não florescem. Segundo o mesmo autor, o florescimento da espécie na Índia acontece entre setembro e novembro, e na Melanésia, de abril a junho. Durante os inquéritos não foi possível afirmar com exatidão o período de florescimento nas regiões amostradas. Embora o sistema de reprodução da maioria das plantas cultivadas clonalmente esteja documentado, o sistema de reprodução sexual dessas espécies é na maioria dos casos pouco conhecido (MCKEY et al., 2010). Embora se saiba que o inhame neste caso é reproduzido por seções do tubérculo, ou por mini-tubérculos (na qual alguns agricultores chamam de semente), sua reprodução sexuada nunca deixou de existir, mesmo as plantas apresentando reduzida fertilidade. No entanto, não foi registrado nestas entrevistas se os agricultores recorrem à reprodução sexuada de *D. alata*.

Em relação ao uso de insumos e de máquinas agrícolas foi observado que na região nordestina o trabalho é, sobretudo, manual e que pouco ou nada de insumos agrícolas é utilizado pelos agricultores. Dado o elevado custo dessas práticas e também pela cultura do inhame estar associada a comunidades de baixo poder aquisitivo, foi constatada na maioria das entrevistas o

baixo uso dos mesmos. Essa situação se diferenciou ligeiramente nas outras regiões. No entanto, registramos alguns agricultores que fazem o uso de aditivos químicos, outros com o uso de pequenos tratores conseguem aumentar suas produções, e verificamos também o relato de uma consciência ecológica no uso de insumos orgânicos.

Já no Estado de São Paulo visitaram-se dois agricultores mais tecnificados conforme comentado acima, nos municípios de Mogi Guaçu e Mogi Mirim, um dos quais considerado um grande exportador da espécie *D. alata* (cultivar Florida), na qual sua área de grandes dimensões é altamente mecanizada, fazendo-se uso de insumos químicos e de um grande número de trabalhadores contratados.

É interessante observar que a maioria dos agricultores visitados planta o inhame junto com outras culturas (59%), ou seja, utilizam o consórcio, que é mais típico dos pequenos agricultores que utilizam a cultura para a subsistência. No entanto, observou-se também um grande número de agricultores que plantam o inhame separadamente (41%), seja para fins comerciais ou não. Apesar de existirem algumas restrições técnicas quanto ao cultivo de inhame em sistema de consórcio, sabe-se que as culturas complementares favorecem economicamente o produtor, diminuindo os custos de produção da cultura principal e permitem melhor utilização da mão de obra disponível (PEIXOTO NETO et al., 2000). Algumas culturas indicadas para consórcio com inhame foram observadas nos municípios, tais como feijão, amendoim, soja e melancia. No entanto, observou-se principalmente nesta pesquisa culturas não indicadas para o consórcio com o inhame, tais como a mandioca, milho, girassol e sorgo. Para Peixoto Neto et al. (2000) vários aspectos são importantes na hora de selecionar o consórcio. Porém, um dado importante é que muitas culturas competem de forma comprometedora mais do que as outras, não somente pela exigência de nutrientes, como pelo consumo excessivo de água, principalmente se forem de ciclo vegetativo mais longo. Este tipo de conhecimento, na maior parte dos casos é ignorado pelos agricultores que reclamam sobre a falta de apoio técnico.

Com relação ao consumo, a espécie *D. alata*, à semelhança da espécie *D. cayenensis*-*D. rotundata* é comumente usada como importante fonte na dieta alimentar, destacando-se a excelente riqueza em carboidratos e proteínas. Na região nordeste o inhame é usado de forma

cozida acompanhado com manteiga de garrafa¹⁰. Relatos de agricultores de Santa Catarina foram feitos em relação à farinha de inhame, usada no fabrico de pães e biscoitos, sendo também usado pelos mais velhos como complemento no café da manhã. Relatos feito por Pedralli (2002b) destaca o uso de espécies de *Dioscorea* em comunidade indígenas como contraceptivos, devido ao teor de saponinas esteroidais, no entanto, não refere se esse uso é feito a partir de *D. alata*. O mesmo autor refere também outros usos interessantes, que apesar de não terem sido observados neste trabalho, merecem referência. Comunidades indígenas Guaranis do Sul do Brasil usam cinzas das “tuberosidades” como equivalentes ao sal de cozinha e porções dessas túberas são secas e torradas e usadas como equivalentes ao café. Mais uma vez o autor não refere se essas aplicações provêm de *D. alata*, e pelas entrevistas realizadas neste trabalho não foram identificados tais usos. No entanto, alguns trabalhos têm visado o resgate de receitas tradicionais usando inhame na sua confecção, pratos esses criados por comunidades rurais de várias regiões do Brasil, inclusive dos locais aqui visitados (PEIXOTO NETO et al., 2000; LIMA, 2002; BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2010). A farinha de inhame, a ser usada na produção de pão de forma, por exemplo (FONSECA, 2006), poderia ser outro negócio rentável para os agricultores de pequeno porte, visto que o uso na fabricação de salgadinhos do tipo snacks a partir de túberas de *D. alata* já mostrou características desejadas pelos consumidores (ALVES; GROSSMANN, 2002).

4.4 Conclusões

Este estudo mostrou que a espécie *D. alata* está sendo cultivada em diferentes agroecossistemas, e que existe uma nítida regionalização na atribuição de nomes populares para as diferentes variedades dentro da mesma espécie, e que a importância desses agricultores na manutenção desta grande diversidade é um fator de extrema relevância. Para a atual percepção do perfil de agricultores brasileiros, em diversas regiões que mantêm acessos de inhame, em seus quintais e em suas roças, um extenso trabalho de campo foi realizado mostrando a realidade de um Brasil com diferentes facetas.

¹⁰ A manteiga de garrafa é obtida pelo cozimento do creme de leite até que se evapore toda a água e restem apenas a gordura e as partículas sólidas da nata. É comercializada em garrafas sendo muito difundida em toda região nordestina do Brasil.

Dentro desses espaços, onde a diversidade genética de inhame se amplifica, mas também se sujeita a agentes estressores, verificamos que para que sejam atingidas metas nas políticas de conservação agroecológica é necessário que sejam incrementados e realizados mais estudos deste gênero. Um dos principais objetivos será ampliar o conhecimento sobre essas espécies a partir da obtenção de novos germoplasma *in situ* ou *ex situ*, aumentando a base genética para o melhoramento e resgatando possíveis materiais sujeitos ao processo de erosão genética.

Referências

- ABRAMO, M.A. **Taioba, cará e inhame**: o grande potencial inexplorado. São Paulo: Editora Ícone, 1990. 80 p.
- ABRAMOVAY, R.; SILVESTRO, M.; CORTINA, N.; BALDISSERA, T., FERRARI, D.; TESTA, V.M. **Juventude e agricultura familiar**: desafios dos novos padrões sucessórios. Brasília: Edições Unesco, 1998. 104 p.
- ALVES, R.M.; GROSSMANN, M.V.E. Parâmetros de extrusão para produção de “snacks” de farinha de cará (*Dioscorea alata*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.1, p. 32-38, 2002.
- AMOROZO, M.C.M. Management and conservation of *Manihot esculenta* Crantz germplasm by traditional farmers in Santo Antonio do Leverger, Mato Grosso State, Brazil. **Etnoecologica**, México, v.4, p.69-83, 2000.
- AMOROZO, M.C.M. Maintenance and management of agrobiodiversity in small-scale Agriculture. **Functional Ecosystems and Communities**, Middlesex, v.2, p.11-20, 2008.
- ASEMOTA, H.N.; RAMSER, J.; LOPÉZ-PERALTA, C.; WEISING, K.; KAHL, G. Genetic variation and cultivar identification of Jamaican yam germplasm by random amplified polymorphic DNA analysis. **Euphytica**, Wageningen, v.92, p.341-351, 1996.
- AUGUSTO, H.A.; RIBEIRO, E.M. O envelhecimento e as aposentadorias no ambiente rural: um enfoque bibliográfico. **Organizações. rurais e agroindustriais**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 199-208, 2005.
- BRAGA, H; GUELLRE, R. Proposta climática para o Estado de Santa Catarina. In: Congresso Brasileiro de agrometeorologia, 9; Reunião latino americana de agrometeorologia, 2, 1999. Florianópolis. **Anais...**Florianópolis: Sociedade Brasileira de Agrometeorologia. 1999.
- BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Hortaliças não-convencionais**: (tradicionais) / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: MAPA/ ACS, 2010. 52 p.

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

BRUSH, S.B. Protecting traditional agricultural knowledge. **Journal of Law and Policy**, Washington, v.17, p.59-109, 2005.

BYARUGABA, D.; NDEMERE, P.; MIDGLEY, J. The vulnerability and resilience of *Dioscorea* species in utilized and nonutilized zones of Bwindi Impenetrable National Park. **African Journal of Ecology**, Oxford, v.45, p.258–264, 2006.

CAMARANO, A.A.; ABRAMOVAY, R. **Êxodo rural, envelhecimento e masculinização no Brasil: panorama dos últimos 50 anos**. IPEA. 1999. Disponível em: www.ipea.gov.br. Acesso em: 13 abril 2011(Texto para discussão, 621).

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

CARNEIRO, M.J. Herança e gênero entre agricultores familiares. **Revista Estudos Feministas**, Florianópolis, v.9, n.1, p.22-55, 2001.

CAVALCANTE, E. **História de Mato Grosso**. Cuiabá: Carlin & Caniato, 2006, p. 10.

CHAÏR, H.; CORNET, D.; DEU, M.; BACO, M.N.; AGBANGLA, A.; DUVAL, M.F.; NOYER, J.L. Impact of farmer selection on yam genetic diversity. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 11, p.2255–2265, 2010.

CUNHA, J.M.P. Dinâmica migratória e o processo de ocupação do Centro-Oeste brasileiro: o caso de Mato Grosso. **Revista brasileira de estudos populacionais**, São Paulo, v.23, p.87-107, 2006.

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; ZOUNDJIHEKPON, J.; SANGARE, A.; ASIEDU, R.; QUIN, F.M. Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*) complex in BeninRepublic. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.46, p.371–388, 1999.

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.

DE ANJOS, F.S.; CALDAS, N.V. O futuro ameaçado: o mundo rural face aos desafios da masculinização, do envelhecimento e da desagrarização. **Ensaio FEE**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 661-694, 2005.

EMPERAIRE, L.; PERONI, N. Traditional management of agrobiodiversity in Brazil: a case study of manioc. **Human Ecology**, New York, v.35, p.761-768, 2007.

ENJALBERT, J.; DAWSON, J.C.; PAILLARD, S.; RHONÉ, B.; ROUSSELLE, Y.; THOMAS, M.; GOLDRINGER, I. Dynamic management of crop diversity: From an experimental approach to on-farm conservation. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v.334 p.458–468, 2011.

FAOSTAT. **FAOSTAT Database**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 17 de Jul. 2009.

FERREIRA, A.B. **Sistemas de cultivo do cará *Dioscorea* spp. por pequenos agricultores da Baixada Cuiabana – MT**. 2011. 94p. Tese (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2011.

FERREIRA, A.B.; MING, L.C.; CHECHETTO, F.; PINTO, R.A. Dioscoreáceas cultivadas por agricultores da baixada Cuiabana em Mato Grosso – Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 6, p.201-208, 2010.

FONSECA, E.W.N. **Utilização da mucilagem de inhame (*Dioscorea* spp) como melhorador na produção de pão de forma**. 2006. 79p. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

GARRIDO, M.S.; SOARES, A.C.F.; MENDES, L.N.; PEREZ, J.O. O estudo de novas tecnologias para a produção de inhame no Estado da Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.6, n.1, 2003.

GALLUZZI, G.; EYZAGUIRRE, P.; NEGRI, V. Home gardens: neglected hotspots of agrobiodiversity and cultural diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, v.19, p.3635–3654, 2010.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 3.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. 653p.

GODOY, C.M.T.; PÉREZ, F.I.C.; WIZNIEWSKY, J.G.; GUEDES, A.C.; MORAES, C.S. Juventude rural, envelhecimento e o papel da aposentadoria no meio rural: A realidade do município de Santa Rosa/RS. In: CONGRESSO SOBER (Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 48., 2010. Mato Grosso do Sul – MS, **Anais...** Mato Grosso do Sul – MS, 2010. 1 CD-ROM.

JARVIS, D.I.; MYER, L.; KLEMICK, H.; GUARINO, L.; SMALE, M.; BROWN, A.H.D.; SADIKI, M.; STHAPIT, B.; HODGKIN, T. **A training guide for in situ conservation on-farm**. Version 1. Rome: IPGRI, 2000. 189p.

JULIATTI, J.C.; SARAIVA, J.S.T.; COSTA, E.B.; CARMO, C.C.S. In: CARMO, C.A.S. (Ed.) **Inhame e taro: sistemas de produção familiar**. Vitória, ES: INCAPER, 2002. p. 51-60.

- LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids**. Wallingford, CABI, 2009. 440p. (Crop production science in horticulture series, 17).
- LIMA, M.G.M. **Alternativas para o consumo do inhame**. Salvador, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A. (EBDA), 2002. 42p.
- MARTINS, P.S.; OLIVEIRA, G.C.X. Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos. In: Vieira, I.C.G.; da Silva, J.M.C.; Oren, D.C. & D'Incao, M.A. **Diversidade biológica e cultural da Amazônia**. 2a. ed. Parte III, cap. 4. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi. 2009. p.373-391.
- MCKEY, D.; ELIAS, M.; PUJOL, B.; DUPUTIE, A. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. **New Phytologist**, Cambridge, v.186, p. 318–332, 2010.
- MENDES, L.N.; GARRIDO, M.S.; OLALDE, A.R.; SILVA, T.O. Caracterização dos produtores de inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) do município de Maragogipe, BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 41., 2003. Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Equipe S3, 2003. 1 CD-ROM.
- MILLER, R.P.; NAIR, P.K.R. Indigenous agroforestry systems in Amazonia: from prehistory to today. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v.66, p.151-164, 2006.
- 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: INCAPER, 2002. p.84-92.
- MONTEIRO, D.A.; PERESSIN, V.A. Cultura do inhame. In: CEREDA, M.P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p.511-518.
- OKOLI, O. O.; ONWUEM, I. C. Yam and the African food crisis. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 3., 1986, Owerri. **Annals...** Owerri: ISTRB-AC, 1986. p. 50-54.
- OLIVEIRA, R.R.; LIMA, D.F.; SAMPAIO, P.D. Roça Caiçara: um sistema "primitivo" auto-sustentável. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.18, p.43-51, 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, 2002a. p.15-26.
- PEDRALLI, G. Dioscoreaceae e Araceae: aspecto taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA. 2002b. p.37-53.
- PEDRALLI, G.; CARMO, C.A.; CEREDA, M.; PUIATTI, M. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.530-532, 2002.

PERONI, N.; HANAZAKI, N. Current and lost diversity of cultivated varieties, especially cassava, under swidden cultivation systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.92, p.171-183, 2002.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; LOPES FILHO, J.; CAETANO, L.C.; ALENCAR, L.M.C.; LEMOS, E.E.B. **Inhame: o Nordeste fértil**. Maceió, AL: EDUFAL, 2000. 88p.

PINHEIRO, G.S.R. **Agricultor familiar e projeto agroecológico de vida**. 2004.134p. Tese (Mestrado em Sociologia das Organizações) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.

RESENDE, R.U. **As regras do jogo: legislação florestal e desenvolvimento sustentável no Vale do Ribeira**. São Paulo: Annablume; FAPESP, 2002. 198 p.

ROCHA JUNIOR, C.J.G.; COSTA, J.H.Q.; MOUTINHO, L.M.G.; CARNEIRO, A.J.O.L.L.; CAMARGO, A.J.O.L.L. Percepção dos produtores de *Dioscorea* spp., do município de Chã Preta-AL-Brasil, em relação às orientações técnicas no campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 41., 2003. Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Equipe S3, 2003. 1 CD-ROM

SAMBATI, J.B.M.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. Folk taxonomy and evolutionary dynamics of cassava: a case study in Ubatuba, Brazil. **Economic Botany**, New York, v.55, p.93-105, 2001.

SANTOS, A.H. **O Vale do Rio Taia-Hy - levantamento de aráceas e dioscoreáceas comestíveis no litoral norte catarinense**. 2005. 135p. Tese (Mestrado em Agroecossistemas). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, p.70-84, 2000.

SIQUEIRA, M.V.B.M; VEASEY, E.A. Raíces y tubérculos tropicales olvidados o subutilizados en Brasil. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, Bogotá, v.3, p.110-125, 2009.

SMITH, N.J.H. Home gardens as a springboard for agroforestry development in Amazonia. **International Tree Crops Journal**, Herts, v.9, p.11-30, 1996.

SPANEVELLO, R.M. **A dinâmica sucessória na agricultura familiar**. 2008. 236p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SUNDERHUS, A.B. **Agricultura familiar - desafiando um paradigma social e político para sustentabilidade**. Disponível em: www.dae.ufla.br/revista. Acesso em: 19 abr 2011.

WEISHEIMER, N. **Os jovens agricultores e seus projetos profissionais: Um estudo de caso no bairro de Escadinhas, Feliz/RS**. 2004. 215p. Tese (Mestrado em Sociologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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.

ZÁRATE, N.A.H.; VIEIRA, M.C.; MINUZZI, A. Brotação de seis tipos de mudas dos clones de inhame roxo e mimoso. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.4, p.699-704, 2002.

5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *DIOSCOREA ALATA* L. E TRANSFERIBILIDADE PARA OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO ¹¹

Resumo

O gênero *Dioscorea* possui cerca de 600 espécies tropicais e subtropicais. Algumas delas têm grande importância comercial, como é exemplo a espécie *Dioscorea alata*. No entanto, e apesar de presente em muitas roças e quintais do Brasil, as variedades comerciais oriundas de programas de melhoramento genético são praticamente inexistentes. Somando a isso, fatores como o êxodo rural e mudanças de hábitos alimentares tornam o inhame uma espécie subutilizada e negligenciada. Há a necessidade de um esforço para melhorar a produção dessas olerícolas, gerar variedades resistentes e criar planos de conservação *in situ* e *ex situ*. O desenvolvimento de marcadores moleculares tem importância nesse processo, já que podem fornecer subsídios a planos de melhoramento e conservação. O desenvolvimento de marcadores moleculares são importantes nesse processo já que podem ser excelentes ferramentas para o sucesso desses planos. Os microsatélites são a classe mais informativa existente de marcadores genéticos e amplamente usados em estudos de genética de população. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de marcadores microsatélites de *D. alata* a partir da construção de uma biblioteca enriquecida em microsatélites bem como o desenho de primers para tais sequências. A partir da biblioteca genômica enriquecida de *D. alata* foram desenhados pares de primers para 14 sequências, sendo que posteriormente as sequências foram depositadas no *GenBank*. Obteve-se elevada qualidade nas amplificações, via PCR, dando suporte ao uso destes locos em estudos genéticos de *D. alata*. Dos 14 primers desenhados, 10 foram selecionados pela sua melhor resolução, sendo que nove destes apresentaram polimorfismo. Com os nove primers polimórficos, foram analisados 80 acessos de *D. alata* provenientes de quatro regiões brasileiras (Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste) para obtenção de parâmetros genéticos. Em paralelo, para os 10 pares de microsatélites selecionados foram realizados testes de transferibilidade para as espécies *D. bulbifera*, *D. trifida* e *D. cayenensis*-*D. rotundata*, sendo que seis destes primers mostraram boa transferibilidade, variando de 33% a 100%.

Palavras-chave: Biblioteca genômica enriquecida; Diversidade genética; Inhame; Microsatélites.

Abstract

The genus *Dioscorea* has about 600 tropical and subtropical species. Some of them have great commercial importance, as exemplified by the species *Dioscorea alata*. However, although present in many fields and homegardens in Brazil, the commercial varieties derived from breeding programs are virtually nonexistent. Adding to that, factors such as rural exodus and changes in eating habits make a yam species underutilized and neglected. There is a need for an effort to improve the production of vegetables, produce resistant varieties and create plans for *in situ* and *ex situ* conservation. The development of molecular markers is important in this process, since

¹¹ Este capítulo gerou a seguinte publicação: SIQUEIRA et al. (2011).

they can provide input to management plans and conservation. Microsatellites are the most informative existing in the class of genetic markers and wide used in population genetic studies. This study aimed to develop microsatellite markers for *D. alata* from the construction of a microsatellite-enriched library and the design of primers for these sequences. From the enriched genomic library of *D. alata* primer pairs were designed for 14 sequences and subsequently the sequences were deposited in the GenBank. We obtained high quality in the amplification via PCR, supporting the use of these loci in genetic studies of *D. alata*. From the 14 primers, 10 were selected for their better resolution and nine showed polymorphism. With nine polymorphic primers, we analyzed 80 accessions of *D. alata* from four regions (South, Southeast, West-Center and Northeast) in Brazil to obtain genetic parameters. In parallel, for the 10 selected primer pairs of microsatellite, transferability tests were performed for the species *D. bulbifera*, *D. trifida* and *D. cayenensis*-*D. rotundata*, and six of these primers showed good transferability, ranging from 33% to 100% transferability, for the three species.

Keywords: Microsatellite-enriched library; Genetic diversity; Yam; Microsatellites

5.1 Introdução

Conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), os marcadores microssatélites baseiam-se na detecção de variações em locos de sequências repetitivas, que apresentam geralmente de dois a seis pares de bases (HANCOCK, 2000). Essas variações no número de repetições resultam, em última análise, em variações no comprimento dos segmentos detectados, que são amplificados via PCR e separados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, corados com nitrato de prata ou em fluorescência.

A redução dos custos das técnicas para o desenvolvimento de primers específicos, bem como uma alta gama de aplicações tem tornado os marcadores SSR um marcador de extrema importância em genotipagem de vários organismos, inclusive de plantas (GUICHOUX et al., 2011). Uma importante vantagem dos marcadores microssatélites sobre os demais é a sua codominância (MUDGE et al., 1997; KALIA et al., 2011). A codominância torna-os mais informativos para análises de caracterização genética, tanto em espécies cultivadas [batata-doce (ARIZIO et al., 2008), batata (VERONICA et al., 2007), melão (NIMMAKAYALA et al., 2008), uva (SCHUCK et al. 2009) e cevada (NAEEM et al., 2011)] como em populações naturais [*Sambucus palmensis* Link (SOSA et al., 2011), orquídeas neotropicais (PINHEIRO et al., 2010) e bromélias (PALMA-SILVA et al., 2011)]. São muitos os exemplos de estudos com finalidades de proteção de variedades e conservação de germoplasma (RIBEIRO-CARVALHO et al., 2004; ARIZIO et al., 2008), estudos de diversidade e conservação de espécies em risco de extinção

(SEGARRA-MORAGUES et al., 2005), entre outros. Nos últimos anos os marcadores SSRs deixaram de ser apenas uma ferramenta para de modismo para geneticistas e melhoristas (SCHLÖTTERER, 2004); ecólogos têm usado esta importante ferramenta para responder a inúmeros questionamentos no campo da ecologia (SELKOE; TOONEN, 2006).

Para se trabalhar com marcadores microssatélites, de início pode-se procurar por sequências desta natureza em bancos de dados disponíveis, ou desenvolver-se uma biblioteca genômica enriquecida (BILLOTE et al., 1999; ZANE et al., 2002). Como método tradicional de isolamento de microssatélites tem-se as bibliotecas genômicas, que consistem em um conjunto de clones de DNA nos quais são selecionados os fragmentos de interesse (SNUSTAD; SIMMONS, 2001; KALIA et al., 2011).

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram desenvolver a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites de *D. alata*, realizar o desenho de primers microssatélites a partir das sequências da biblioteca genômica enriquecida com microssatélites e, finalmente, efetivar a geração de marcadores microssatélites para esta espécie, realizando simultaneamente análises de transferibilidade de pares de primers para *D. bulbifera*, *D. cayenensis* – *D. rotundata* e *D. trifida*.

5.2 Material e métodos

Foi desenvolvida neste estudo uma biblioteca genômica enriquecida de microssatélites, específica para a espécie *Dioscorea alata*, seguindo-se um conjunto de protocolos durante o curso “Construção de bibliotecas enriquecidas em microssatélites de eucariotos” (ANEXO IV), no CBMEG/UNICAMP, sob a supervisão da Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, e com a monitoria do aluno Thiago Marconi. A seguir encontram-se descritos os protocolos utilizados, a partir de uma amostra de um acesso de *D. alata*, cuja extração de DNA foi baseada no método CTAB 3% (SIQUEIRA et al., 2009), com modificações. Para esta etapa, foram utilizados 200 ng/ul de DNA, quantificado em gel de agarose 1%, utilizando-se o corante *Blue Green* (LGC, Brasil) e soluções padrões (5, 20, 40, 80 e 160 ng) de DNA (LGC). Desta forma, encontram-se descritos os diversos passos para a obtenção da biblioteca enriquecida de microssatélites para *D. alata*, segundo metodologia de Billote et al. (1999).

5.2.1 Genotipagem dos acessos utilizando os locos de microssatélites desenvolvidos para *D. alata*

5.2.1.1. Material utilizado

Para a avaliação das sequências desenvolvidas, foram utilizados inicialmente três acessos de *D. alata* para a definição da temperatura de anelamento, concentração de magnésio e demais procedimentos da análise de PCR. Já para a genotipagem, foram avaliados um total de 80 acessos de *D. alata*, provenientes de cada uma das cinco regiões (Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste). Destes acessos incluíram-se acessos locais e comerciais dos Estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Mato Grosso, Amazonas, Pernambuco, Piauí e Paraíba. Dezesete acessos locais foram provenientes da região Nordeste, 18 da Centro-Oeste, 18 da região Sudeste, nove da região Sul e apenas uma da região Norte. Dezesete acessos comerciais foram obtidos de bancos de germoplasma, feiras e mercados locais. Devido à diversidade genética da espécie ser desconhecida no país, as amostras foram selecionadas de forma a obter uma grande abrangência de regiões distintas.

5.2.1.2 Extração de DNA

Vários protocolos de extração foram testados no sentido de se obter a maior e melhor quantidade de DNA, no entanto, seguimos o protocolo de extração de Sharma et al. (2008) com algumas modificações, protocolo este específico para raízes e tubérculos.

Coletaram-se folhas jovens (recém expandidas), colocando-as imediatamente em nitrogênio líquido e armazenando-as em freezer -80°C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e, em seguida, maceradas. Macerou-se aproximadamente 300 mg de folhas em cadinho de porcelana. Adicionou-se posteriormente 1 mL de tampão de extração CTAB (aqueceu-se o tampão previamente). Transferiu-se para eppendorfs de 2 mL e adicionou-se 5 uL de Proteinase K. Logo após incubou-se a 37 °C por 30 min. e a 65 °C por 30 min (com agitação frequente). Centrifugou-se a 6500 rpm por 600 segundos. Coletou-se o sobrenadante (0,5 mL) e transferiu-se para novos eppendorfs. Adicionou-se a mesma quantidade (0,5 mL) de clorofórmio-isoamil álcool (24:1) e agitou-se manualmente 30-40 vezes. Centrifugou-se a 6500 rpm por 600 segundos e o sobrenadante (0.5 mL) foi transferido para um novo tubo. Colocou-se 200 uL de

NaCl (2M) contendo PEG 4%. Incubou-se por 15 min a 4°C (geladeira). Centrifugou-se a 6500 rpm por 600 segundos. Adicionou-se isopropanol (1 mL) e efetuou-se uma centrifugação a 6500 rpm por 600 segundos. Lavaram-se com wash solution todos os tubos e realizou-se uma centrifugação a 8000 rpm por 1 min. Novamente procedeu-se a lavagem com wash solution e a centrifugação a 8000 rpm por 1 min. O precipitado foi colocado para secar a temperatura ambiente (cerca de 2h). Adicionou-se 50 µl de TE e 4 µl de RNase (10 mg/mL) por indivíduo e incubou-se a 37 °C por 30 min sendo finalmente armazenado a -20°C.

O DNA obtido foi quantificado em géis de agarose 1%, tomando-se por referencial o DNA padrão (com amplitude de variação de 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 150 e 200 ng), e corados com o corante *Blue Green* e fotodocumentado (Figura 12).

Figura 12 - Gel de agarose (1%) para quantificação de DNA, corado com o corante *Blue Green*, para amostras concentradas e diluídas

5.2.1.3 Testes de temperatura

Três acessos de *D. alata* foram utilizados para os testes de temperatura com 14 iniciadores de microssatélites de *Dioscorea* (A4, A5, A7, B5, C12_B, C5, D9, E10, E11, F1, F10, G4, H12 e H2). As reações de PCR foram realizadas com os seguintes reagentes em cada tubo: 0,2 µL de TAQ-Polimerase (5U/µL); 1,6 µL de Tampão (10X); 0,8 µL MgCl₂ (25 mM); 0,48 µL de Primer F (5pmoles/µL); 0,48 µL de Primer R (5pmoles/µL); 1,28 µL de dNTP's (2,5 mM de cada), 7,16 µL de H₂O Milli-Q e 4 µL de DNA (15 ng), totalizando 16 µL. Esses tubos foram submetidos a um programa de amplificação que consistiu nas seguintes fases: desnaturação a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 51°C e demais temperaturas a serem testadas (temperaturas de anelamento) por 1 min, e 72°C por 1 min, com uma extensão final de 72°C por 8 min. Realizado em termociclador de gradiente *Bioer Lifepro*, testou-se oito temperaturas de anelamento (T1 = 50°C, T2 = 51°C, T3 = 53°, T4 = 55°C, T5 = 58°C, T6 = 60°C, T7 = 62°C e T8 = 63°C) para cada acesso (Figura 13).

Figura 13 - Gel de acrilamida (7%) para teste de temperatura considerando três acessos (A, B e C) aleatórios de inhame (*Dioscorea alata*) para oito temperaturas (T1 a T8).

5.2.1.4 Testes de concentração de magnésio

Realizaram-se testes de concentração de magnésio (15, 20 e 25 mM) em primers da literatura e para os novos primers tendo sido utilizado para este fim quatro acessos de *D. alata* (DGC 71, DGC 106, DGC 253 e DGC 266) (Figura 14).

Figura 14 - Gel de agarose (3%) ilustrando a otimização de MgCl₂ em três diferentes concentrações para os primers 9C e H12

5.2.1.5 Eletroforese

Para a realização da eletroforese procedeu-se à preparação das placas de vidro obedecendo aos seguintes procedimentos: aplicação de 2 mL de dimetildiclorosilano em octametil ciclo-octasilano (Plus One Repel Silane ES, Amersham Biosciences) sobre a placa maior (33 x 41,5 cm) e na placa menor (33 x 39 cm) aplicou-se 5 µL de metacriloxipropil-trimetoxisilano (Bind Silane, Amersham Biosciences) diluído em 1 mL de uma solução composta por 0,5% de ácido acético glacial e 99% de etanol. Após a secagem das mesmas, procedeu-se à montagem. Para o preparo do gel, foram utilizados 80 mL de solução de acrilamida 7% (175 mL acrilamida líquida 29:1, 100 mL de TBE 10X, 420 g de uréia), além de 240 µL de persulfato de amônio 10% e 100 µL de TEMED. A solução de acrilamida 7% foi aplicada no gel com auxílio de um aplicador.

Após 60 min de polimerização, as placas foram colocadas em uma cuba vertical (MODEL C.B.S. Scientific Dual Unit), onde os géis foram pré-aquecidos por 40 min a 70 W de potência constante. Aplicou-se 4 µL das amostras previamente desnaturadas com 2 µL de tampão de carregamento (95% formamida, 0,05% de xylenicynanol; 0,05% de azul de bromofenol, 12,5% de sacarose e 10 mM de NaOH) a 94°C por 5 min. Procedeu-se a corrida a uma potência inicial de 40 W por 10 min e posteriormente a 50 W durante quatro horas (esse tempo médio diferiu entre os primers). Utilizou-se como marcador de peso molecular, o *ladder* de 10 pb (Invitrogen).

A coloração foi realizada em cinco etapas, de acordo com Creste et al. (2001), com modificações, conforme os seguintes passos:

- Etapa 1 (fixação): a fixação do gel foi feita por imersão em solução de etanol 10% e ácido acético 1%, agitando por 10 min, seguida de uma lavagem com água destilada, durante 1 min;
- Etapa 2 (oxidação): o pré-tratamento foi realizado com solução de ácido nítrico 1% durante 5 min, seguindo-se de uma lavagem do gel com água destilada, com duração de 1 min;
- Etapa 3 (impregnação com prata): a impregnação do gel foi feita em solução de nitrato de prata (1,5 g/L) durante 20 min, sob agitação, seguida de duas novas lavagens com água destilada, com duração de 30 seg cada;
- Etapa 4 (revelação): para a revelação dos géis, foi utilizada uma solução (30g/litro de Na_2CO_3 e 500 μL de formaldeído/L) usada e gelada (4°C), agitando cuidadosamente até a mesma se tornar escura. Após este passo, a solução foi descartada e uma nova solução reveladora foi aplicada para finalizar o processo, seguindo-se de uma lavagem com água destilada, durante 1 min;
- Etapa 5 (bloqueio): o bloqueio da revelação foi feito em solução de ácido acético 5% durante 5 min, seguindo-se uma nova lavagem com água destilada durante 1 min. Após a etapa de bloqueio da revelação a placa foi colocada em posição vertical em um local seco e arejado, sob temperatura ambiente para a secagem do gel.

5.2.1.6 Testes de transferabilidade

Os testes de transferibilidade das nove sequências de primers para outras três espécies do gênero *Dioscorea* (*D. bulbifera*, *D. trifida* e *D. cayenensis*-*D. rotundata*) encontram-se apresentados na Tabela 6. Foram utilizados oito acessos de cada uma das três espécies do gênero. O protocolo para o teste de transferabilidade seguiu os demais anteriores à exceção do PCR que foi realizado a partir do programa *touchdown* usando as seguintes condições: 1º usou-se uma fase de 94°C por 5 min, seguido de uma 2ª fase de 11 ciclos a 95°C por 30s, 55°C a 45°C por 30 s (gradiente de temperatura reduzindo um grau em cada ciclo, iniciando-se a 55°C e finalizando-se a 45°C) e 72°C por 50s. Uma 3ª fase foi realizada por 30 ciclos a 95°C por 30s, 45°C por 30s e 72°C por 50s.

5.2.1.7 Análise dos dados

Os dados obtidos para os 80 genótipos foram submetidos à análise do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de modo a obter o grau de informação dos marcadores (CORDEIRO et al., 2000). O PIC, segundo Botstein et al. (1980), fornece uma estimativa do poder discriminativo do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). No entanto, é um parâmetro que apresenta uma dependência do número de alelos e suas frequências. O PIC é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Em que: p_i e p_j são as frequências alélicas.

Para o cálculo do parâmetro PIC utilizou-se o website: <http://www.genomics.liv.ac.uk/animal/Pic1.html>

Com o propósito de comparar a eficiência dos marcadores na identificação genotípica, estimou-se o parâmetro D (*Discriminating Power*) para cada primer (TESSIER et al., 1999). O parâmetro D é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$D_j = 1 - C_j = 1 - \sum_{i=1}^l p_i \frac{(Np_i - 1)}{N - 1}.$$

5.3 Resultados e discussão

Dos 14 pares de primers desenhados e sintetizados, dez foram amplificados com sucesso via PCR para temperaturas que variaram de 50°C a 63°C (Tabela 5). Alguns testes mostraram mais de uma temperatura ideal para um determinado primer, optando-se por escolher a temperatura em que os alelos se mostraram mais isentos de *stutters* e com melhor resolução. Nove primers apresentaram polimorfismo e um primer (F10) mostrou-se monomórfico, e como tal não foi incluído nas análises dos 80 acessos. Um total de 47 bandas foram obtidas a partir dos nove locos. A amplitude de alelos apresentou-se entre 142 pb e 260 pb, com uma média de 4 alelos por loco.

Dessa forma, repetidos testes de otimização fizeram-se necessários para alguns primers. A maioria dos primers mostrou melhor resposta aos testes de magnésio com concentração de 25 mM. As 9 sequências testadas foram submetidas ao *GenBank* tendo sido atribuído uma identificação individual para cada sequência.

Um estudo semelhante foi desenvolvido por Tostain et al. (2006) com três espécies (*Dioscorea alata*, *Dioscorea abyssinica* e *Dioscorea praehensilis*) e 16 pares de primers foram obtidos ao todo. Deste trabalho surgiram os primeiros pares de microsatélites para *D. alata*, num total de cinco primers, no entanto o estudo, diferentemente do presente, não focou como já referido em apenas uma espécie. Hochu et al. (2006), a partir de uma biblioteca enriquecida, desenharam 20 primers de microsatélites para espécie *D. trifida*, sendo que apenas oito pares de primers apresentaram bandas polimórficas e de boa resolução. Os autores genotiparam os novos microsatélites em 24 acessos, número bastante inferior ao testado para *D. alata* no presente trabalho.

Utilizando-se, portanto, nove locos de microsatélites, o número de alelos por loco variou de 3 a 8, com uma média de 5,22 alelos/loco. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,393 a 0,778 (média de 0,652). O maior valor de PIC foi encontrado para o loco H12 (PIC=0,778), o qual apresentou o maior número de alelos (9 alelos). A heterozigosidade esperada variou de 0,512 a 0,805, com média de 0,700. Hochu et al. (2006) obteve um número de alelos por loco não muito diferente (2 a 13) e a heterozigosidade esperada para *D. trifida* (0,5) foi relativamente inferior ao obtido para *D. alata*. Na biblioteca enriquecida de microsatélites criada por Tostain et al. (2006) a heterozigosidade esperada foi de 0,59 e o número médio de alelos por loco foi de 7,3 (num total de 117 alelos).

Para comparar a eficiência de discriminação dos primers (TESSIER et al., 1999), calculou-se o poder de discriminação (D) que variou de 0,15 a 0,91, com média de 0,68. Os maiores valores de D foram encontrados para os primers H2 (0,916) e B5 (0,902) (Tabela 5).

Pelos dados obtidos de transferibilidade, os primers A4, F1, H12, H2 mostraram 100% de transferibilidade para as espécies avaliadas de *Dioscorea*, sendo que o primer C5 só mostrou 67% de transferibilidade e o primer E10 mostrou 33% de transferibilidade (i.e., apenas para *D. trifida*). Três primers (B5, E11 e G4) não apresentaram nenhuma transferibilidade (Tabela 6). Tostain et al. (2006) observaram que a transferibilidade era maior em espécies que pertenciam a mesma seção botânica (*Enantiophyllum*), no entanto essa evidência não foi encontrada no presente estudo.

Tabela 5 - Relação das nove sequências dos microssatélites desenvolvidas para o projeto e o respectivo n.º do GenBank, número de alelos, tamanho e amplitude do produto em pares de base, poder de discriminação (D), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e temperatura de anelamento definidas

Nome do Primer	Sequências	Sequências de primer (5' - 3')	Número do acesso no GenBank	No. de alelos por indivíduo	Nº total de diferentes alelos	Tamanho (pb)	Amplitude (pb)	D	PIC	Ta (°C)
A4	(CT)2(GAA)3GA(GAA)	F:TTCGTTCTCGATAGCGGACT R:CCAGTTCCTCCAGCCTCTTGT	GF110447	1-3	5	152	130-160	0,880	0,706	53
B5	(TG)8	F:TTCCCCTGTAGGAAAAATAGTGA R:CGTCCCTAGAAAATTCAACCTC	GF110448	1-2	7	158	150-160	0,902	0,774	60
C5	(TG)7CG(TA)5	F:AACCAATTACCCTTTGTCATGG R:GCCTTGCAAGCAATTTTGA	GF110450	1-3	3	172	145-180	0,488	0,454	58
E11	(CCA)4(CA)7	F:ATGGTGTCTCCCATGCTTC R:ACCAAAAAATCAGGCTTGTGC	GF110452	2-4	4	258	240-280	0,589	0,594	55
F1	(TA)5	F:ATGGCTCAAGAGCACACG R:GGGCCTCATAAACATGCAAT	GF110453	1-3	6	158	130-180	0,586	0,637	58
G4	(CA)10	F:TGAGCCTCCTATTTCCTCAAG R:ATCAAGTCCAGGATCGCTCA	GF110454	1-3	5	203	190-210	0,746	0,696	62
H12	(AT)6	F:TTGTAATTGGGTGTTGTATTTGC R:CGGCCAAAACATTTTCTGAT	GF110455	2-4	8	157	140-160	0,884	0,778	53
H2	(CA)9	F:AAACCAAACAGGCAAAGCAT R:TGCCCTGCTTGTAAGATTGA	GF110456	2-4	6	232	160-250	0,916	0,776	58
E10	(CA)12	F:GAATACTGATGATGCATAAAGCAA R:CCATGGTGAAGAGGATGGAT	GF110626	1-2	3	168	150-175	0,153	0,393	58

Tabela 6 - Resultados da amplificação dos nove primers usados para a transferibilidade desenvolvidos para três espécies do gênero *Dioscorea*, avaliando-se oito acessos de cada espécie

Locos	<i>D. bulbifera</i>	<i>D. cayenensis-D. rotundata</i>	<i>D. trifida</i>	Transferibilidade para cada loco (%)
A4	+	+	+	100
B5	-	-	-	0
C5	+	-	+	67
E11	-	-	-	0
F1	+	+	+	100
G4	-	-	-	0
H12	+	+	+	100
H2	+	+	+	100
E10	-	-	+	33

+, amplificação obtida com sucesso com uma ou mais bandas com tamanho similar ao encontrado nos resultados com *D. alata*; -, sem amplificação.

5.4 Conclusões

- O protocolo para o desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas em microssatélites é eficiente em *Dioscorea alata*, e permite a obtenção de uma elevada quantidade de sequências microssatélites.
- A construção de bibliotecas genômicas enriquecidas é particularmente interessante em *Dioscorea*, uma vez que poucas sequências foram desenvolvidas e depositadas no *GenBank*. Com esta estratégia, nove novas sequências da espécie *D. alata* foram submetidas à publicação.
- Os primers desenvolvidos, em sua maioria, apresentaram-se polimórficos e serão eficientes para estudos de caracterização de diversidade genética.
- Os resultados de transferibilidade mostraram que seis dos primers desenvolvidos para *D. alata* podem se tornar primers heterólogos para outras espécies do gênero.

Referências

ARIZIO, C.M.; HOMPANERA, N.; SUAREZ, E.Y.; MANIFESTO, M.M. Genotypic identification and diversity evaluation of a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L). Lam) collection using microsatellites. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Rome, v.7, p. 135–138, 2008.

- 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**, New York, v. 54, p. 277-288, 1999.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p.314–431, 1980.
- CORDEIRO, G.M.; TAYLOR, G.O.; HENRY, R.J. Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. **Plant Science**, Limerick, v.155, p.161–168, 2000.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, n.4, p. 299-306, 2001.
- GUICHOUX, E. ; LAGACHE, L. ; WAGNER, S. ; CHAUMEIL, P.; LEGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R.J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.11, p.591–611, 2011.
- HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites**. Oxford: University Press, 2000. p. 1-9.
- HOSHINO, A.A.; BRAVO, J.P.; ANGELICI, C.M.L.C.D.; BARBOSA, A.V.G.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Heterologous microsatellite primers pairs informative for whole genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 665-675, 2006.
- ISPIZUA, V.N.; GUMA, I.R.; FEINGOLD, S.; CLAUSEN, A.M. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v54, p.1833–1848, 2007.
- KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Wageningen, v.177, p.177:309–334, 2011.
- MUDGE, J.; CREGAN, P.B.; KENWORTHY, J.P.; KENWORTHY, W.J.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. Two microsatellite markers that flank the major soybean nematode resistance locus. **Crop Science**, Madison, v.37, p.1611-1615, 1997.
- NAEEM, R.; DAHLEEN, L.; MIRZA, B. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.34, p.268-273, 2011.
- NIMMAKAYALA, P.; TOMASON, Y.R.; JEONG, J.; VAJJA, G.; LEVI, A.; GIBSON, P.; REDDY, U.K. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Rome, v.7, p.127–134, 2008.
- PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARA, T.; FAY, M.F.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms

involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, Oxford, v.20, p.3185-201, 2011.

PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; MEYER, D.; FAY, M.F.; SUZUKI, R.M.; LEXER, C.; COZZOLINO, S.. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v.19, p.3981–3994, 2010.

RIBEIRO-CARVALHO, C.; GUEDES-PINTO, H.; IGREJAS, G.; STEPHENSON, P.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. High Levels of Genetic Diversity Throughout the Range of the Portuguese Wheat Landrace ‘Barbela’. **Annals of Botany**, Oxford, v.94, p.699–705, 2004.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? **Nature**, London, p. 63-69, 2004.

SCHUCK, M.R.; MOREIRA, F.M.; GUERRA, M.P.; VOLTOLINI, J.A.; GRANDO, M.S.; SILVA, A.L. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.44, p.487-495, 2009

SEGARRA-MORAGUES, J.G.; IRIONDO, J.M.; CATALA, P. Genetic Fingerprinting of Germplasm Accessions as an Aid for Species Conservation: A case study with *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae), one of the most critically endangered Iberian plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.96, p. 1283-1292, 2005.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Oxford, v.9, p.615–629, 2006.

SHARMA, K.; MISHRA, A.K.; MISRA, R.S. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, p.1018-1022, 2008.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; SILVA J.R.Q ; BRESSAN, E.A. ; BORGES, A. ; KAYO, P.; VEASEY, E.A. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.32, p.104-110, 2009.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2001. 755p.

SOSA, P.A.; GONZALEZ-PEREZ, M.A.; MORENO, C.; CLARKE, J.B. Conservation genetics of the endangered endemic *Sambucus palmensis* Link (Sambucaceae) from the Canary Islands. **Conservation Genetics**, Arlington, v.11, p.2357–2368, 2010.

TESSIER, C.; DAVID, J.; THIS, P.; BOURSQUOT, J.; CHARRIER, A. Optimizations of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, p.171-177, 1999.

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.

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

6 DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE INHAME (*DIOSCOREA ALATA* L.) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Resumo

Importantes avanços foram feitos nas últimas décadas relativamente a caracterização da diversidade entre as espécies do gênero *Dioscorea*. Contudo, muito desses trabalhos se concentram no que é chamado “cinturão africano”, sendo que muito pouca informação tem sido gerada em outras regiões do mundo. Apresentamos neste estudo, a primeira caracterização no Brasil utilizando microssatélites para a diversidade genética entre acessos comerciais e locais de inhame (*Dioscorea alata*). Foram analisados 73 acessos locais e 17 acessos comerciais coletados em cinco regiões do Brasil. Doze microssatélites foram usados para gerar perfis para cada acesso e quatro caracteres morfológicos foram igualmente usados na análise. A caracterização morfológica apresentou considerável diversidade entre os acessos e nenhum agrupamento específico foi observado entre regiões. Os microssatélites tiveram uma média de PIC de 0,71 e 0,68 para os acessos locais e comerciais, respectivamente. A análise da similaridade entre acessos não separou claramente os genótipos locais dos comerciais. Adicionalmente, não se observou uma estrutura populacional consistente entre as regiões amostradas, sendo que somente os acessos da região Centro-Oeste mostraram uma tendência de agrupamento. Estes resultados confirmam a existência de uma mistura de acessos nas regiões coletadas, a qual é consistente com a falta de correlação significativa entre as regiões e os dados genéticos, sugerindo que esta espécie de inhame tenha uma grande mobilidade a partir do fluxo migratório humano. As análises moleculares de *D. alata* reportadas neste estudo mostram ainda uma alta diversidade intraespecífica para os acessos locais em diferentes regiões do Brasil. A diversidade genética encontrada nesses acessos pode ser explicada por uma troca contínua de tubérculos entre as diferentes regiões brasileiras. Os dados aqui apresentados geram subsídios para programas de melhoramento bem como para o entendimento dos recursos genéticos no país.

Palavras-chave: *Dioscorea* spp.; SSR; Variabilidade genética; Agricultura tradicional; Banco de germoplasma; Caracteres morfológicos

Abstract

Substantial progress was made in the last decade in understanding the characterization of diversity in *Dioscorea* species. However, much of the studies so far concentrated in the ‘yam belt in Africa’, whereas little is known about the status of yams in the other parts of the world. We present a first characterization of the variation among cultivated and local water yams (*Dioscorea alata*) in Brazil. Were analyzed 73 local varieties and 17 commercial accessions of water yam collected in five different regions in Brazil. Twelve polymorphic microsatellite primers were used to generate DNA profiles for each accession of the species and four morphological traits were analyzed. The morphological characterization showed considerable diversity and no specific clustering was observed between regions. The microsatellite markers had average PIC values of 0.71 and 0.68 for local and commercial varieties, respectively. Analysis of the relationship between accessions did not clearly separate the local and commercial genotypes. However, the molecular analyses of *D. alata* showed a high intraspecific diversity in local varieties from

different regions in Brazil. Additionally, we did not observe a strong population structure between sampling regions, only the accessions from the Central-West region showed a tendency to clustering. These results confirmed an admixture of accessions in all sampling regions, consistent with the lack of a significant correlation between geographic and genetic distances, suggesting that water yam have a high mobility by human migratory fluxes. Molecular analysis of *D. alata* reported in this study also shows a high intraspecific diversity for local access in different regions of Brazil. The genetic diversity found can be explained by the result of a continuous exchange of varieties through the Brazilian distribution range. The data presented here generate subsidies for breeding programs as well as for the understanding of genetic resources in the country.

Keywords: *Dioscorea* spp.; SSR; Genetic variability; Traditional agriculture; Germplasm bank; Morphological characters

6.1 Introdução

Estima-se que ocorram no Brasil entre 150 e 200 espécies de *Dioscorea*, único gênero da família presente em todas as regiões do país (PEDRALLI, 2002b). É um gênero bastante disperso que pode ser encontrado tanto em regiões tropicais e sub-tropicais como em temperadas (MONTALDO, 1971; SEAGRI, 2002). As espécies deste gênero são, em geral, poliplóides e de propagação vegetativa, constituindo a alimentação básica para mais de 100 milhões de pessoas em todo mundo, sobretudo nos trópicos úmidos e sub-úmidos (MIGNOUNA et al., 2003b).

Certas culturas, como é o caso do inhame, estão associadas a comunidades de baixa renda, com grande valor como alimento de subsistência, contribuindo para a estabilidade de muitos ecossistemas tradicionais e locais. Mesmo perante tantas contribuições à saúde humana, como alimento saudável e fonte de compostos farmacológicos, o inhame continua sendo marginalizado e fazendo parte das culturas ditas “órfãs”. No Brasil, as espécies negligenciadas, das quais o inhame é um excelente exemplo, estão bastante ameaçadas e encontram-se cada vez mais “esquecidas” na mesa da população rural e urbana (SIQUEIRA; VEASEY, 2009; SIQUEIRA, 2011).

Dioscorea alata é uma espécie originária do continente asiático, possuindo algumas variedades e inúmeros nomes populares no Brasil, tais como: cará São Tomé, Nambu, cará Mandioca, Roxo de Ceilão, Sorocaba, Roxo de Ilhéus, Mimoso, Caipira, Cará Florida, entre outros, este último representando a variedade mais cultivada na região sudeste do Brasil (SANTOS, 1996), tendo sido introduzida pelo Instituto Agrônomo de Campinas na década de 40. Introduzido no Brasil na época da colonização, o inhame, à semelhança de outras espécies, tem recebido pouca atenção da comunidade científica e são praticamente inexistentes os estudos

genéticos aplicados à espécie. Pouco se sabe sobre sua evolução em território nacional e existe uma carência sobre dados moleculares que possam auxiliar em programas de melhoramento e projetos de conservação *in situ* e *ex situ* da espécie.

A variabilidade genética neste sentido pode exercer um papel decisivo na sobrevivência das espécies quando há alteração repentina de um fator ambiental, como por exemplo, as mudanças climáticas, e passará a ter cada vez mais um peso crucial na gestão dos recursos genéticos. Quando uma espécie apresenta base genética estreita, ou seja, pouca variabilidade genética, esta será certamente mais sensível a pragas, doenças e estresses ambientais, tendo menores chances de sobrevivência (ELLSTRAND; ELLAM, 1993). Para a concretização de qualquer programa de conservação e melhoramento genético de uma espécie, é fundamental o conhecimento dos níveis de distribuição da variabilidade entre e dentro das suas populações (SEBBENN et al., 2000).

Os marcadores moleculares são das ferramentas mais importantes para a caracterização genética de recursos vegetais. Entre estes estão os marcadores microssatélites que têm sido cada vez mais utilizados como um instrumento eficaz para a compreensão da estrutura genética de populações, fluxo gênico, grau de parentesco, viabilidade de populações, além de permitir estratégias para a conservação de espécies (LEMES et al., 2003; VARSHNEY et al., 2005; KALIA et al., 2001).

Importantes estudos visando a caracterização genética de espécies de inhame com marcadores microssatélites, realizados no continente africano, permitiram entender a complexidade e o papel dos agricultores na amplificação e manutenção genética desses materiais (OBIDIEGWU et al. 2009a,b; CHAÏR et al. 2010). No entanto, o uso destes marcadores para a espécie *D. alata* é raro, mesmo perante a sua importância nesses países (OBIDIEGWU et al., 2009a).

Muitos dos estudos relacionados à cultura do inhame têm sido reportados ao seu centro de origem e pouco se sabe sobre a distribuição genética dos materiais cultivados em território brasileiro. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi: a) avaliar a diversidade genética, por meio de marcadores microssatélites, de acessos locais de *D. alata* originários de diferentes regiões do Brasil (Sul, Sudeste, Nordeste, Norte e Centro-Oeste) e verificar o grau de diferenciação entre e dentro das regiões amostradas; b) determinar a relação entre a variação genética e a distribuição

geográfica; e c) comparar a diversidade genética de acessos comerciais de *D. alata* com a diversidade genética dos acessos locais.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Coletas e análises morfológicas

O material analisado foi composto por 90 acessos de *Dioscorea alata*, incluindo 73 acessos locais coletados em cinco diferentes regiões do Brasil: Sul (Santa Catarina – SC), Sudeste (São Paulo - SP, Minas Gerais – MG), Norte (Amazonas – AM), Nordeste (Pernambuco - PE, Paraíba - PB, Piauí – PI, Maranhão - MA), Centro-Oeste (Mato Grosso – MT) e 17 acessos comerciais (Tabela 7, Figura 15). Os 17 acessos comerciais foram obtidos junto ao Instituto Agrônômico (IAC), Campinas (com a abreviação SRT), e os restantes em feiras e mercados locais (São Paulo – SP, Mato Grosso – MT, Mato Grosso do Sul – MS, Ceará – CE). Esses acessos foram plantados em casa de vegetação e em campo, representando parte do banco de germoplasma de inhame da ESALQ/USP (com a abreviação DGC). Detalhes sobre os acessos comerciais e locais usados no presente estudo encontram-se nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7 - Informação geral sobre a origem dos acessos de *Dioscorea alata* usados no estudo

Região	Estado	nº municípios	nº acessos locais	nº acessos comerciais
Sudeste (SE)	Minas Gerais (MG)	1	2	0
	São Paulo (SP)	5	20	13
Sul (S)	Santa Catarina (SC)	2	9	0
Centro-Oeste (CO)	Mato Grosso (MT)	7	21	1
	Mato Grosso do Sul (MS)	0	0	2
Nordeste (NE)	Pernambuco (PE)	3	3	0
	Paraíba (PB)	5	9	0
	Piauí (PI)	2	6	0
	Ceará (CE)	0	0	1
	Maranhão (MA)	1	2	0
Norte (N)	Amazônia (AM)	1	1	0
Total		26	73	17

Tabela 8 - Relação de 17 acessos comerciais, na qual é apresentado o número de acesso no germoplasma, bem como a origem de coleta (Município e Estado)

Nº	Acesso	Município	Estado
1	DGC 309	Mogi Guaçu	São Paulo
2	DGC 311	Mogi Mirim	São Paulo
3	DGC 115	Fortaleza	Ceará
4	DGC 116	Cuiabá	Mato Grosso
5	SRT 3	Campinas	São Paulo
6	SRT 29 * (Florida)	-	São Paulo
7	DGC 36	Iguape	São Paulo
8	DGC 39	Piracicaba	São Paulo
9	SRT 66 * (AngolaII)	-	São Paulo
10	SRT 75 * (Leno Dandino)	Iporanga	São Paulo
11	SRT 78 * (Singapura Roxo)	-	São Paulo
12	SRT 89 * (Araraquara I)	Ubatuba	São Paulo
13	DGC 124	Campo Grande	Mato Grosso
14	DGC 125	Três Lagoas	Mato Grosso
15	DGC 128	Belo Horizonte	Minas Gerais
16	DGC 132	Fernandópolis	São Paulo
17	DGC 321	Iguape	São Paulo

* Materiais obtidos do germoplasma de inhame do Instituto Agronômico (IAC), em Campinas, SP. Abreviação SRT: acessos oriundos do IAC (Campinas). Abreviação DGC: acessos oriundos da ESALQ/USP.

Tabela 9 - Relação de 73 acessos locais/tradicionais selecionados, na qual é apresentado o número de acesso no banco de germoplasma, bem como a origem do acesso (município, comunidade e estado, e coordenadas geográficas)

(Continua)

Nº	Acesso	Município	Comunidade/Estado	Nome	Latitude (S)	Longitude (O)
1	DGC 11.1	Iguape	Momuna/SP	Cará branco	24°41'	47°34'
2	DGC 20.0	Iguape	Momuna/SP	Cará aipim	24°41'	47°34'
3	DGC 315	Iguape	Cavalcanti/SP	Cará guaçu	24°43'	47°45'
4	DGC 318	Iguape	Cavalcanti/SP	Cará guaçu roxo	-	-
5	DGC 320	Iguape	Peropava/SP	Cará guaçu branco	24°37'	47°36'
6	DGC 325	Iguape	Momuna/SP	Cará guaçu roxo	-	-
7	DGC 326	Iguape	Momuna/SP	Cará guaçu branco	24°42'	47°40'
8	DGC 71	Cananéia	Rio Branco/SP	Cará branco	24°55'	48°01'
9	DGC 106	Iporanga	Betari/SP	Cará mandioca	24°35'	48°35'
10	DGC 110	Iporanga	-/SP	Cará de sopa	24°35'	48°36'
11	DGC 215	São Luiz do Paraitinga	São Luiz do Paraitinga/SP	Cará branco	23°13'	45°18'
12	DGC 190	Ubatuba	Sertão do Quina/SP	Cará roxo	23°32'	45°15'
13	DGC 192	Ubatuba	Sertão do Ingá/SP	Cará pé de cavalo	23°31'	45°14'
14	DGC 194	Ubatuba	Sertão do Ingá/SP	Cará branco	23°31'	45°14'
15	DGC 199	Ubatuba	Rio Escuro/SP	Cará branco	23°28'	45°08'
16	DGC 206	Ubatuba	Ubatuba/SP	-	23°26'	45°05'
17	DGC 207	Ubatuba	Sertão do Ingá/SP	Cará	23°31'	45°13'
18	DGC 213	Ubatuba	Araribá/SP	Cará pé	23°32'	45°15'
20	DGC 228	Ubatuba	Sertão do Ingá	Moela	23°31'	45°13'
19	DGC 214	Ubatuba	Sertão de Ubatumirim/SP	Cará mandioca	23°17'	44°53'
21	DGC 111	Itacoatiara	-/AM	Polpa branca	03°08'	58°26'
22	DGC 138	Condado	Patrimônio/PE	Cará de São Tomé	07°35'	35°04'
23	DGC 142	Caapora	Capim de Cheiro/PB	Cará de São Tomé	07°30'	34°57'
24	DGC 143	Alhandra	Sítio Acáz de Eixo/PB	Cará de São Tomé	07°24'	34°54'
25	DGC 144	Alhandra	Fazenda Vale Verde/PB	Inhame de São Tomé	07°23'	34°54'
26	DGC 146	Alhandra	Jusara/PB	Inhame de São Tomé	07°25'	34°53'
27	DGC 149	Rio Tinto	Boa Vista/PB	Inhame de São Tomé	06°51'	35°04'
28	DGC 161	Sapé	Melancia/PB	Inhame de São Tomé	07°01'	35°11'
29	DGC 163	Sobrado	Cacurú/PB	Inhame de São Tomé	07°11'	35°15'
30	DGC 165	São José do Monte	Sítio Tamanduá/PE	Inhame de São Tomé	08°26'	35°47'
31	DGC 167	Bonito	Colônia dos Japoneses/PE	Inhame de São Tomé	08°59'	35°43'
32	DGC 170	Regeneração	Chapada Gugel/PI	Inhame mandioca	06°14'	42°36'
33	DGC 171	Regeneração	Chapada Gugel/PI	Inhame branco	06°14'	42°36'
34	DGC 172	Regeneração	Chapada Gugel/PI	Inhame roxo bolota	06°14'	42°36'
35	DGC 173	Regeneração	Chapada Gugel/PI	Inhame roxo	06°14'	42°36'
36	DGC 175	Água Branca	Cedro/PI	Inhame branco	06°10'	40°38'
37	DGC 176	Pedreiras	Canto do Buriti/MA	Inhame branco	42°48'	42°48'
38	DGC 177	Pedreiras	Canto do Buriti/MA	Inhame roxo	42°48'	42°48'

Tabela 9 - Relação de 73 acessos locais/tradicionais selecionados, na qual é apresentado o número de acesso no banco de germoplasma, bem como a origem de coleta (Município, Comunidade e Estado, e Coordenadas Geográficas)

(Conclusão)

39	DGC 179	Água Branca	Cedro/PI	Inhame roxo	06°10'	40°38'
40	DGC 253	Sapé	Assentamento Rainha dos Anjos/PA	Cará de S. José	07°06'	35°10'
41	DGC 266	Sapé	-	-	07°06'	35°11'
42	DGC 278	Conceição dos Ouros	Bairro das Três Cruzes	Cará roxo	22°24'	45°47'
43	DGC 279	Conceição dos Ouros	Bairro das Três Cruzes	Cará roxo	22°24'	45°47'
44	DGC 293	Joinville	Pirabeiraba/SC	Cará pão	26°09'	48°59'
45	DGC 295	Joinville	Pirabeiraba/SC	Cará roxo	26°09'	48°59'
46	DGC 296	Itajaí	Laranjeiras/SC	Cará pão	26°58'	48°48'
47	DGC 297	Joinville	Pirabeiraba/SC	Cará	26°09'	48°59'
48	DGC 299	Itajaí	São Roque/SC	Cará pão	26°54'	48°45'
49	DGC 304	Itajaí	Itajaí/SC	Cará pão	24°54'	48°39'
50	DGC 305	Itajaí	Itajaí/SC	Cará	26°54'	48°39'
51	DGC 307	Joinville	Pirabeiraba/SC	Cará branco	26°12'	48°55'
52	DGC 308	Itajaí	Laranjeiras/SC	Cará pão	26°58'	48°48'
53	DGC 333	Cuiabá	P.A. 21 de Abril/MT	Cará roxo	15°35'	56°05'
54	DGC 231	Tangará da Serra	Tangará da Serra/MT	Cará	14°38'	57°30'
55	DGC 232	Cuiabá	Cuiabá/MT	Cará	15°35'	56°05'
56	DGC 334	Jangada	Sto. Antonio do Barreiro/MT	Cará manchado	15°14'	56°29'
57	DGC 337	Cuiabá	São Gernonimo	Cará roxo	15°35'	56°05'
58	DGC 338	Cuiabá	P.A. 21 de Abril/MT	Cará roxo	15°35'	56°05'
59	DGC 339	Cuiabá	Rio dos Couros/MT	Cará lavanca	15°51'	56°04'
60	DGC 347	Sto Antonio do Leverger	Vale Verde/MT	Cará canga	15°51'	56°04'
61	DGC 348	Poconé	Córrego Fundo/MT	Cará branco	16°14'	56°37'
62	DGC 349	Cuiabá	Raizama/MT	Cará	15°51'	56°04'
63	DGC 353	Sto Antonio do Leverger	Alto do Leverger/MT	Cará roxo	15°51'	56°04'
64	DGC 356	Rosário Oeste	Timbozal	Cará branco	14°50'	56°25'
65	DGC 357	N. Senhora do Livramento	P.A. Aterrado/MT	Cará lavanca	15°46'	56°21'
66	DGC 358	Cuiabá	Rio dos Couros/MT	Cará	15°51'	56°04'
67	DGC 363	Cuiabá	Cuiabá/MT	Cará pele roxa		
68	DGC 365	Cuiabá	São Geronimo/MT	Cará	15°51'	56°04'
69	DGC 369	N. Senhora do Livramento	Rio dos Couros/MT	-	15°46'	56°21'
70	DGC 370	N. Senhora do Livramento	Barranco Alto/MT	Cará inhame	15°46'	56°21'
71	DGC 108	Sto Antonio do Leverger	Carandazinho/MT	-	15°51'	56°04'
72	DGC 234	Tangará da Serra	Tangará da Serra/MT	Cará roxo	14°38'	57°30'
73	DGC 241	N. Senhora do Livramento	N. Senhora do Livramento/MT	Cará ou inhame	15°46'	56°21'

Figura 15- Mapa do Brasil indicando os 26 municípios onde 90 acessos de *Dioscorea alata* foram coletados (quadrados [1-17]: acessos comerciais; círculos [18-90]: acessos locais)

Quatro descritores morfológicos foram medidos individualmente em cada planta durante o mês de agosto de 2010. Os descritores incluíram: (i) formato do tubérculo [redondo, alongado ou irregular]; (ii) tamanho do tubérculo [longo (> 30 cm), médio (entre 10 e 30 cm) e pequeno (< 10 cm)]; (iii) cor da casca [marrom, marrom claro e marrom escuro]; e (iv) cor da polpa [roxo, branco-roxo, branco, e creme], de acordo com IPGRI (1997), com algumas adaptações (Tabela 10).

Tabela 10 - Número de acessos (em parêntesis) para cada grupo e para cada caráter morfológico a partir de dados de 90 acessos de inhame (*Dioscorea alata*)

	Comerciais (17 acessos)	Sudeste (22 acessos)	Sul (9 acessos)	Centro-Oeste (21 acessos)	Nordeste (20 acessos)	Norte (1 acesso)
Formato						
Redondo	10	8	3	0	6	1
Alongado	2	12	1	10	10	0
Irregular	5	2	5	11	4	0
Tamanho						
Grande	0	6	1	7	4	0
Médio	9	8	4	9	7	1
Pequeno	8	8	4	5	9	0
Cor da casca						
Marrom	16	18	9	14	19	1
Marrom Claro	0	4	0	7	2	0
Marrom escuro	1	0	0	0	0	0
Cor da polpa						
Roxa	0	1	0	0	0	0
Branca- Roxa	1	9	0	10	2	0
Branca	15	8	7	7	17	0
Creme	1	4	2	4	1	1

6.2.2 Extração de DNA

Folhas recém expandidas foram coletadas e liofilizadas por 48h. O DNA foi extraído a partir de 50 mg de folhas liofilizadas usando CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) (SHARMA et al., 2008), com modificações. Durante cada lavagem com *wash solution* usamos duas centrifugações extras (8000 rpm por 300 s) e um maior tempo (2h) na incubação com RNase. A qualidade de DNA foi visualizada em géis de agarose a 1% corados com *Blue Green* (LGC, Brasil) seguido de eletroforese com voltagem de 110 V por 1h, e a concentração foi determinada com concentrações conhecidas de DNA lambda (Invitrogen, Brasil). O gel foi visualizado por UV e foto-documentado (Canon Utilities Remote Capture DC).

6.2.3 Amplificação por PCR

Usou-se um total de nove primers SSR desenvolvidos especificamente para este estudo (SIQUEIRA et al., 2011) e foram acrescentados outros 3 primers SSR da literatura (TOSTAIN et al., 2006) (Tabela 11). As reações de PCR foram conduzidas em um volume total de 16 µL usando-se um termociclador automático (modelo: *Bioer Lifepro*), incluindo os componentes 0.2

μL *Taq* polimerase (5 U/ μL) (LGC, Brasil); 1.6 μL 1X Tampão de Amplificação (sem Mg^{+}); 0.8 μL MgCl_2 (25 mM); 0.48 μL Primer Forward (5pmoles/ μL); 0.48 μL Primer Reverse (5pmoles/ μL); 1.28 μL dNTP's (2.5 mM de cada), 7.16 μL Milli-Q H_2O e 4.0 μL (5 ng/ μL) de DNA. As reações de PCR foram desenvolvidas usando os seguintes programas: 5 min a 94°C , 30 ciclos a 94°C por 30 s, 1 min na temperatura de anelamento definida para cada primer (Tabela 11) e 1 min a 72°C ; e uma etapa final de extensão de 1 min a 72°C . Para os SSR desenvolvidos por Tostain et al. (2006) o programa foi similar com exceção de 35 ciclos a 94° por 30 s e uma etapa de extensão de 8 min. A separação dos produtos de amplificação foram realizados em géis desnaturantes de poliacrilamida 6% em sistema de eletroforese a 60 V por 30 min e 120 V por 3 h e 30 min. Os produtos foram visualizados com nitrato de prata de acordo com Creste et al. (2001). Os padrões de bandas foram avaliados em um transluminador e fotografados usando uma câmera digital (Figura 16).

Tabela 11 – Caracterização genética dos microssatélites usados nas análises dos acessos de inhame (*Dioscorea alata*), incluindo número de alelos por locos (A), temperatura de anelamento (Ta), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) para os acessos locais (AL) e acessos comerciais (AC)

Nome do primer	Sequência 5' à 3' do primer	Código do GenBank	Tamanho do Produto (pb)	A	Amplitude (pb)	Ta (°C)	Alelos exclusivos	PIC AL	PIC AC
F1*	F:ATGGCTCAAGAGCACACG R:GGGCCTCATAAACATGCAAT	GF110453	158	5	130-180	58	3	0,66	0,77
E10*	F:GAATACTGATGATGCATAAAGCAA R:CCATGGTGAAGAGGATGGAT	GF110626	168	3	150-175	58	1	0,50	0,56
H2*	F:AAACCAAACAGGCAAAGCAT R:TGCCCTGCTTGTAAGATTGA	GF110456	232	6	160-250	58	5	0,80	0,81
C5*	F:AACCAATTACCCTTTGTCATGG R:GCCTTGCAAGCAATTTTGA	GF110450	172	3	145-180	58	1	0,56	0,55
A4*	F:TTCGTTCTCGATAGCGGACT R:CCAGTTCCCAGCCTCTTGT	GF110447	152	5	130-160	53	1	0,75	0,76
H12*	F:TTGTAATTGGGTGTTGTATTTGC R:CGGCCAAAACATTTTCTGAT	GF110455	157	8	140-160	53	1	0,82	0,74
B5*	F:TTCCCCCTGTAGGAAAAATAGTGA R:CGTCCCTAGAAAAATTCAACCTC	GF110448	158	7	150-160	60	1	0,80	0,72
G4*	F:TGAGCCTCCTATTCCCAAG R:ATCAAGTCCAGGATCGCTCA	GF110454	203	5	190-210	62	3	0,77	0,64
E11*	F: ATGGTGTCTCCCATGCTTC R: ACCAAAAATCAGGCTTGTGC	GF110452	258	4	240-280	55	4	0,68	0,50
9C**	F:AAT GCT TCG TAA TCC AAC R:CTA TAA GGA ATT GGT GCC	AJ880367	177	5	159-173	53	4	0,74	0,70
4C**	F: GCC TTT GTG CGT ATC T R: AAT CGG CTA CAC TCA TCT	AJ880366	163	5	165-190	55	5	0,67	0,70
3C**	F:TAT AAT CGG CCA GAG G R:TGT TGG AAG CAT AGA GAA	AJ880381	204	5	217-275	50	2	0,77	0,77
Média				5,08			2,58	0,71	0,68

* Siqueira et al. 2011; ** Tostain et al. 2006

Figura 16 - Géis de acrilamida (7%) com diferentes perfis alélicos. Na parte superior, genotipagem de acessos de *Dioscorea alata* com o primer G4, e na parte inferior, genotipagem de acessos de *D. alata* com o primer 4C. M – marcador de 10 pb

6.2.4 Análise estatística

Dioscorea alata é uma espécie poliplóide (ARNAU et al., 2009) e, portanto, gera muitos padrões diferentes de bandas. No presente estudo, os padrões gerados foram anotados como se tratando de um marcador dominante, criando-se uma matriz binária. Segundo Tamiru et al. (2007), as bandas são consideradas polimórficas se estiverem presentes em pelo menos um acesso. Bandas que não podiam ser claramente determinadas, fosse pela baixa intensidade ou outro fator, eram tratadas como dados ausentes. O número de alelos (bandas) por locos e o número de alelos exclusivos (alelos detectados em uma única população) foram avaliados manualmente. Os valores de conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foram calculados de acordo com Botstein et al. (1980) usando R 2.10.0 (R Development Core Team, 2009).

Um dendrograma foi construído usando o pacote PHYLIP 3.65 (FELSENSTEIN, 2005). As distâncias genéticas foram calculadas de acordo com o método original de Nei e Li (1979) e uma árvore foi construída usando o método de Neighbour-Joining (SAITOU; NEI, 1987). De forma a conduzir uma análise primária de bootstrap descartou-se todos os genótipos com mais de 50% de dados ausentes. A apresentação gráfica da árvore foi obtida pelo software FigTree 1.3.1 (RAMBAUT, 2009).

Uma análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) foi realizada somente com as 73 variedades locais usando o software Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER et al., 2005) de forma a estimar a variação genética entre e dentro de regiões.

Para verificar o grau de mistura de genótipos entre regiões usou-se o método bayesiano de Pritchard et al. (2000), implementado pela presença/ausência de marcadores no software STRUCTURE 2.3.1 (FALUSH, 2007). O software STRUCTURE foi rodado usando um modelo de mistura e repetido cinco vezes por cada K (número de agrupamentos assumidos) com um *burn-in* de 500,000 interações seguido de 500,000 interações de MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Para estimar o melhor valor de k , realizou-se uma análise estatística de agrupamento (ROSENBERG et al., 2005) e estimou-se a média de todas as repetições de k . O valor de agrupamento mais alto foi atingido para $k=2$. Além disso, CLUMPP (JAKOBSSON, 2007) foi usado para mesclar as diferentes matrizes de Q e a atribuição do agrupamento foi plotado com *distruct* (ROSENBERG, 2004). Adicionalmente, foi conduzida uma análise de coordenadas principais (PCoA) usando o sistema GNU R com o package *adeigenet* (JOMBART, 2008).

Para o cálculo da diversidade, usou-se o índice de Shannon (também chamado de índice Shannon-Weaver ou de índice do Shannon-Wiener), H' , calculado pelo software POPGENE v.1.32 (YEH et al., 1997). O índice de Shannon é um dos diversos índices usados para medir a diversidade em dados categóricos. É simplesmente a informação entrópica da distribuição, tratando as espécies como símbolos e o tamanho da respectiva população como uma probabilidade. Este índice mede o grau de certeza em que se prevê a proximidade genética entre indivíduos; quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. A diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice. Para o cálculo desse índice usou-se a seguinte fórmula:

$$H' = \sum_{i=1}^s (p_i \log p_i)$$

A grande maioria dos estudos em genética e estrutura de populações com tetraploides, usando marcadores codominantes realiza suas análises com avaliação binária, convertendo os dados em dominantes (RODZEN et al., 2004; HANSON et al., 2008). A estimativa de sub estruturação em relação ao local ou região dentro de populações pode também ser realizada através das Estatísticas - F hierárquicas, que podem fornecer informações interessantes para planos de manejo e conservação (JEFFREY; HARTL, 2004). O F_{st} , entretanto, tem certas

limitações como: i) resultados enviesados quando aplicados a locus multi-alélicos de evolução rápida; ii) não identificação de relação genealógica; iii) resultados enviesados em casos de populações ameaçadas (PEARSE; CRANDALL, 2004); iv) deve ser utilizado apenas sobre locos neutros. Devido aos avanços computacionais e tecnológicos, estatísticas análogas ao F_{ST} têm sido desenvolvidas para diminuir suas limitações. Usando uma nova metodologia, na qual espécies tetraplóides são avaliados por sua frequência alélica, alguns parâmetros genéticos foram calculados (G_{ST} , D_m e R_{ST}) (PUYVELDE et al., 2010) complementando os demais dados acima analisados. Para estas análises, excluíram-se os acessos comerciais (por terem diferentes proveniências) e o único acesso da região Norte.

Através da análise da diversidade genética em populações subdivididas é possível a obtenção de uma estimativa de divergência (G_{ST}) (NEI, 1977). A proporção da diversidade genética entre regiões, ou o coeficiente de diversidade genética entre populações (G_{ST}) foi calculada seguindo a seguinte fórmula:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Sendo que aqui consideramos G_{ST} o resultado entre a diversidade genética de uma determinada região sob o valor da diversidade total das regiões. A diversidade genética interpopulacional é uma medida absoluta de diferenciação genética, e é independente da diversidade genética dentro de subpopulações. Entretanto, pode ser usada para comparação de graus de diferenciação de diferentes espécies usando-se a seguinte fórmula:

$$D_m = s D_{ST} / (s - 1)$$

Onde o índice D_m é o resultado do índice D_{ST} (definido anteriormente) sob o número de regiões (aqui definido como s) menos um. Para o cálculo do índice R_{ST} , considerado um índice análogo ao F_{ST} ¹², que mede a divergência intrapopulacional e que corrige a elevada taxa de mutação de marcadores microsatélites. Para esse efeito, usou-se a seguinte fórmula:

$$R_{ST} = D_m / H_S$$

¹² Para mais detalhes sobre estes e outros parâmetros consultar Holsinger e Weir (2009) e Whitlock (2011) onde os autores além de descreverem estes e outros índices, apresentam suas aplicações no campo da genética de populações.

Onde o valor R_{st} é o resultado do índice D_m (definido anteriormente) sob a diversidade genética dentro de regiões (aqui definido como H_s).

Para avaliar a relação genética entre as regiões, foi calculada a distância genética (NEI, 1977) entre todos os pares de regiões. Para o cálculo da distância genética entre as quatro regiões, usaram-se 1000 simulações de Monte Carlo para todos os 12 locos de microsatélite.

6.3 Resultados

6.3.1 Dados morfológicos

Três atributos para o formato dos tubérculos (redondo, alongado e irregular), foram encontrados em todas as regiões, com a exceção do Centro-Oeste onde tubérculos com formato redondo não foram observados (Tabela 10).

A região Norte, onde apenas um acesso foi coletado, mostrou um tubérculo redondo. O tamanho dos tubérculos (de 5 a >70 cm de comprimento) foram medidos, contudo os acessos comerciais não apresentaram tubérculos com mais de 30 cm, de forma que tubérculos grandes não foram encontrados nesta classe. A casca marrom foi a principal cor observada em todas as regiões para o perfil marrom claro, marrom escuro ou simplesmente marrom. A polpa dos tubérculos variou entre as cores: creme, branca, roxa e branca-roxa. A cor roxa foi observada em apenas um acesso na região Sudeste, no município de Ubatuba, São Paulo. A cor branca-roxa foi a predominante no Sudeste e na região Centro-Oeste, e foi observada em apenas uma variedade comercial (SRT 78). Com exceção de dois acessos, todos os acessos comerciais apresentaram cor branca. A cor branca apresentou-se em alto número em todas as regiões. A cor creme foi encontrada em menor proporção nas regiões analisadas e em apenas um acesso comercial.

6.3.2 Dados genéticos

Um total de 61 alelos foram amplificados a partir de 12 marcadores SSR em 90 acessos, com o número de alelos observado por loco variando de 3 a 8, com uma média de 5,08 alelos por locos (Tabela 11). O número de alelos exclusivos variou de 1 a 5, com uma média de 2,58 alelos

exclusivos por loco. Foi observado polimorfismo em todos os 12 microssatélites analisados. Baseado no conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), todos os 12 locos foram classificados como locos informativos ($PIC > 0.5$) (Tabela 11). Os valores de PIC para os acessos locais variou de 0,50 (detectado no loco E10), a 0,82, detectado no loco H12, apresentando um valor médio de 0,71. Para os acessos comerciais, os valores de PIC variaram de 0,50, detectado no loco E11, a 0,81 detectado no loco H2, com um valor médio de 0,68. Acredita-se que a razão da grande proximidade dos valores de PIC, entre acessos locais e comerciais, prende-se com a origem dos acessos comerciais que não sofreram um estreitamento genético em programas de melhoramento; uma boa parte dos acessos comerciais adquiridos para o estudo provém diretamente de áreas de agricultura tradicional/local. Isto é, a fronteira entre estes dois grupos, comerciais e locais, torna-se praticamente inexistente quanto observado por este parâmetro.

A tabela 12 apresenta alguns parâmetros analisados nas cinco regiões de estudo. O maior número de alelos encontrado foi na região Sudeste (42 alelos) e o menor número na região Norte (22 alelos), embora esta região tenha sido composta apenas por um acesso. A região Sudeste revelou três alelos exclusivos e apenas um alelo exclusivo foi detectado na região Nordeste. A presença desses alelos privativos sugere a existência de um isolamento dos acessos da região SE, principalmente entre os acessos do Vale do Ribeira, SP, o que não influi diretamente no fluxo gênico que, no caso do inhame, se resume à troca de túberas. Os valores de PIC por região variaram de 0,50 a 0,82, com uma média de 0,65.

Tabela 12 - Parâmetros genéticos dos marcadores microssatélites usados para analisar 73 acessos de inhame (*Dioscorea alata*) em cinco regiões do Brasil: Sudeste (SE), Sul (S), Centro-Oeste (CO), Nordeste (NE) e Norte (N)

Região	A ¹	PA	PIC
SE	42	3	0,53 – 0,81 (0,67)
S	37	0	0,50 – 0,82 (0,66)
CO	37	0	0,50 – 0,81 (0,65)
NE	38	1	0,50 – 0,79 (0,65)
N	22	0	0,50 – 0,75 (0,62)

¹A – número de alelos por região; PA – número de alelos exclusivos por região; PIC – Amplitude do PIC por região. Em parêntesis o valor médio.

A diferenciação genética entre os grupos foi analisada pela AMOVA e nenhuma significativa variância genética ($P = 0,15934$) foi detectada entre e dentro de regiões (Tabela 13), isto é, as regiões do presente estudo não representam grupos genéticos. A variância dentro de regiões apresentou o maior valor (95,91%) da variação total, enquanto que 4,09% da variação foi observada entre as regiões. O valor de $\Phi_{st} = 0,046$ indicou uma baixa diferenciação genética entre as regiões.

Tabela 13 - Análise da variância molecular (AMOVA) gerado por dados SSR a partir de 73 acessos locais de *Dioscorea alata* coletados em 26 municípios de cinco regiões do Brasil

Fonte de variação	GL ¹	SQ	VC	%VT	p
Entre regiões	4	3,371	0,023	4,09	0,15934
Dentro de Regiões	68	36,437	0,536	95,91	
Total	72	39,808	0,559		-

¹Graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), componentes de variância (VC), percentagem da variação total (%VT) e o valor de probabilidade (p) para 1023 permutações.

O método Neighbor-Joining foi usado para analisar a relação entre os acessos locais e comerciais. O dendograma construído para os 90 acessos gerou uma visão da diversidade estrutural (Figura 17). Os valores de bootstrap foram baixos com a maioria dos nós associados a valores <50% e deste modo não apresentado no gráfico. Nenhum grande agrupamento pode ser observado pelo dendrograma com exceção dos acessos da região Centro-Oeste (CO) que mostrou um relativo agrupamento na parte superior da árvore. Nenhum agrupamento específico foi observado nos acessos comerciais que se apresentaram dispersos entre as regiões.

Figura 17- Dendrograma obtido pelo método neighbor joining mostrando a relação genética entre 73 acessos locais de *Dioscorea alata* de cinco regiões diferentes do Brasil e 17 acessos comerciais a partir de 12 marcadores microsatélites

A relação entre os 73 acessos locais foi novamente comparada pela análise das coordenadas principais (PCoA) entre as cinco diferentes regiões. As duas primeiras coordenadas principais apresentaram 12,9 e 10,4% da variação total. Na análise de PCoA, novamente não foi observado nenhum agrupamento específico (Figura 18). Os acessos da região Centro-Oeste (CO) constituíram um maior agrupamento no lado esquerdo da primeira coordenada do gráfico, misturada com acessos de outras regiões. Por outro lado, os acessos do Nordeste (NE) agruparam-se mais no lado direito da primeira coordenada do gráfico. Essa análise foi consistente com os resultados gerados pelo dendrograma (Figura 17).

Figura 18 - Variação entre 73 acessos locais de inhame (*Dioscorea alata*) revelada pela análise das coordenadas principais (PCoA) baseado na distância média de agrupamento calculado a partir de 12 marcadores microssatélites

O agrupamento bayesiano com o software STRUCTURE não separou claramente as cinco regiões analisadas e mostrou evidência de uma grande mistura entre elas. Os acessos locais foram classificados em dois agrupamentos ($K = 2$) (Figura 19). Ambos os grupos continham acessos de todas as regiões analisadas. A maioria dos acessos do Centro-Oeste foram observados no primeiro agrupamento (cinza escuro), enquanto que no segundo grupo (cinza claro), observou-se que a maioria dos acessos provinham do Sudeste e Nordeste. Os acessos do Sul foram alocados em ambos os agrupamentos em proporções iguais. Assim, os resultados obtidos pelo STRUCTURE estão de acordo com os resultados obtidos no dendrograma NJ e na análise PCoA, mostrando que

todas as regiões apresentam uma grande mistura de acessos, e que apenas a região Centro-Oeste apresenta uma população mais homogênea.

Figura 19 – Agrupamento desenvolvido pelo software STRUCTURE com 73 acessos locais de inhame (*Dioscorea alata*) usando diferentes regiões do Brasil (base $K = 2$)

Todas as análises de estrutura e similaridade populacional entre os acessos sugerem que não existe isolamento geográfico entre os genótipos. Esta constatação é suportada a partir de uma fraca, mas significativa correlação entre as distâncias genéticas e geográficas ($r = 0,05$; $p = 0,016$; Teste de Mantel) (MANTEL, 1967).

Para o cálculo da diversidade genética, usando o índice de Shannon, realizaram-se duas análises separadamente. A primeira foi feita separando os acessos em dois grupos distintos: 17 acessos comerciais e 73 acessos locais. Os valores apresentaram um índice de Shannon superior para os acessos locais ($H' = 0,40$) e inferiores para os acessos comerciais ($H' = 0,33$) (Tabela 14). Numa segunda análise, separaram-se os 73 acessos locais nas regiões onde os mesmos foram coletados. Este índice apresentou o maior valor na região Sudeste ($H' = 0,41$) e o menor valor na região Sul ($H' = 0,28$), sendo que a região Norte, por conter apenas um acesso, obteve-se um valor de $H' = 0$.

Tabela 14 - Análise da diversidade genética gerada a partir do Índice de Shannon entre os acessos comerciais e locais de inhame (*Dioscorea alata*)

Acessos	Índice de Shannon
Comerciais	$H' = 0,33$
Locais	$H' = 0,40$
Acessos/regiões	
Sudeste	$H' = 0,41$
Sul	$H' = 0,28$
Centro-Oeste	$H' = 0,34$
Nordeste	$H' = 0,33$
Norte	$H' = 0$

Para complementar as análises efetuadas a partir de dados binários, procurou-se usar uma nova metodologia que respeita a ploidia da espécie. Para tal, foram calculadas várias variáveis genéticas (G_{st} , D_m e R_{st}) (Tabela 15).

As combinações Sul/Centro-Oeste e Centro-Oeste/Nordeste obtiveram os maiores valores para os parâmetros G_{st} , D_m e R_{st} (0,00698, 0,01088 e 0,01406, respectivamente) e a combinação Sul/Nordeste os menores valores (0,00113, 0,00173 e 0,00227). Esses parâmetros indicam maior diferenciação genética entre as regiões S/CO e CO/NE e uma maior aproximação genética entre os materiais do Sul e do Nordeste.

Tabela 15 – Parâmetros genéticos dos marcadores microsatélites usados para analisar acessos de inhame (*Dioscorea alata*) de quatro regiões do Brasil (SE – Sudeste, S – Sul, CO – Centro- Oeste e NE – Nordeste).

	SE/S	SE/CO	SE/NE	S/CO	S/NE	CO/NE
G_{st}	0,00542	0,00343	0,00311	0,00698	0,00113	0,00693
D_m	0,00832	0,00534	0,00477	0,01088	0,00173	0,01075
R_{st}	0,01090	0,00691	0,00634	0,01406	0,00227	0,01396

Diversidade genética entre populações (G_{st}), diversidade genética interpopulacional (D_m) e R_{st} , divergência genética intrapopulacional.

Finalmente, realizou-se o cálculo das distâncias genéticas entre as quatro regiões (SE, S, CO e NE) (Tabela 17). Verificou-se que os pares de regiões mais distantes são o Centro-Oeste/Nordeste (0,119) e Centro-Oeste e Sul (0,097). Esses dados estão coerentes com os dados apresentados na Tabela 15, que mostram maior diferenciação genética entre os acessos locais dessas regiões. Já o par de regiões mais próximo é o par Nordeste/Sudeste (0,045), o que está também coerente com os dados da Tabela 15 verificando-se que quanto maior as distâncias genéticas, mais distantes as regiões.

Tabela 16 – Distância genética para quatro regiões do Brasil (SE – Sudeste, S – Sul, CO – Centro- Oeste e NE – Nordeste) onde é praticado o cultivo de inhame (*Dioscorea alata*)

	SE	S	CO	NE
SE	0			
S	0,088	0		
CO	0,093	0,097	0	
NE	0,045	0,089	0,119	0

6.4 Discussão

6.4.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica para os quatro caracteres em 90 acessos de inhame foi realizada a partir da forma e tamanho do tubérculo, cor da casca e cor da polpa. Os resultados apresentaram considerável diversidade para esses caracteres. A cor da polpa branca entre os 17 acessos comerciais mostrou que, embora duas variedades apresentaram as cores branca-roxa e creme, a cor branca é uma característica fixada para os propósitos comerciais. Em mercados e feiras os tubérculos redondos e de tamanho pequeno/médio são os mais frequentes.

Analisando os 73 acessos por região, observou-se que não existe nenhum caráter fixado, i.e, é possível encontrar uma alta variação dentro desses quatro descritores morfológicos nas regiões do estudo. É interessante sublinhar que as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste apresentam uma grande amplitude de cores de polpa, com a cor roxa observada apenas na região Sudeste. Supondo que apenas alguns clones foram introduzidos da África durante o período da colonização, e que a propagação vegetativa é o único método usado pelos agricultores nas diferentes regiões do Brasil, podemos presumir que agricultores tradicionais e locais mantêm um processo de seleção que amplifica a variabilidade para algumas características. Contudo, novos estudos fazem-se necessários para entender melhor esses processos, tanto nas regiões analisadas, como em outras aqui não apresentadas, bem como para outros caracteres morfológicos não apresentados aqui.

Alguns estudos foram realizados no sentido de entender com mais precisão a variação morfológica intra-específica de *D. alata* (MARTIN; RHODES, 1977; LEBOT et al., 1998), e esclareceram que: (a) os descritores morfológicos têm um limitado valor informativo, e (b) não é possível encontrar uma estrutura clara baseado nessas variações morfológicas. A amplitude de

valores encontrados para um perfil, em particular em acessos de *D. alata*, revela que há espaço para melhoramento em longo prazo e por seleção clonal em curto prazo (LEBOT et al., 2006). No entanto, até ao momento, nada é conhecido sobre as bases genéticas desses caracteres (LEBOT et al., 2006).

Um estudo mais detalhado realizado por Hasan et al. (2008) com 70 acessos provenientes da Malásia (uma das regiões considerada centro de origem e diversidade da espécie) demonstrou haver variabilidade inter e intragrupos. Similarmente aos nossos resultados, o trabalho revelou que não foi verificado um padrão de agrupamento entre os acessos da Malásia. Contudo, Hasan et al. (2008) foram mais além na pesquisa e descobriram caracteres que podem ser úteis como marcadores para classificar cultivares em programas de melhoramento genético, tais como o tamanho da túbera e a cor da polpa, a posição e o tamanho das folhas, a cor da nervação, cor do pecíolo, número de dias para a germinação do tubérculo, entre outros.

No presente estudo, explorar as variedades locais em programas de melhoramento de inhame, usando diferentes cores de polpa (por exemplo, cor roxa e cor creme) e introduzir esses materiais no mercado, poderia diversificar a opção dos consumidores. Tanto quanto se sabe, a lacuna de estudos com caracteres/descriptores morfológicos tem duas consequências principais: (i) a ausência de informação dificulta o acesso e o desenvolvimento de programas de melhoramento em inhame e (ii) a mesma ausência de dados pode tornar inviável planos de conservação de recursos genéticos em dioscoreáceas. Para ambas as consequências um maior problema pode ser gerado: a erosão genética de variedades tradicionais e locais. Esta situação pode ser irreversível em várias regiões do mundo onde o inhame é cultivado extensivamente.

6.4.2 Diversidade genética

A genética do inhame é uma das menos compreendidas entre as principais culturas alimentares, devido a várias restrições biológicas e muita negligência à investigação básica. Pesquisas para desvendar a aparente complexidade do genoma do inhame terá profundas implicações para o melhoramento genético dessa importante cultura. Algum progresso tem sido obtido nos últimos anos na caracterização de germoplasma e desenvolvimento de marcadores moleculares para análise genômica (MIGNOUNA et al., 2003; TOSTAIN et al., 2006; TAMIRU et al., 2007; ZANNOU et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2011).

Nos últimos 200 anos, a espécie *D. alata* tem sido cultivada em vários estados do Brasil, através de muitas comunidades tradicionais e locais. Alguns desses agricultores mantêm práticas de cultivo como o sistema de coivara, em diferentes agroecossistemas do país. Apesar dos sistemas de cultivo poderem se diferenciar entre eles, uma característica comum entre esses sistemas é o cultivo de várias espécies e variedades de plantas usadas para alimentação (MARTINS; OLIVEIRA, 2009), permitindo a coexistência de uma alta diversidade inter e intra-específica. Diferentes ciclos de vida e estados de domesticação, tais como selvagens, semi-domesticadas e cultivadas, são um aspecto importante em roças de agricultura tradicional, que exige práticas de cultivo diversificados e servem a múltiplos propósitos (GALLUZZI et al., 2010). Além disso, o conhecimento tradicional de agricultores locais é uma das fontes de alta importância para a obtenção da diversidade encontrada entre inhames na África (ZANNOU et al., 2006) e em outras regiões do mundo (LEBOT et al., 1998). No entanto, esta ainda não se encontra devidamente documentada na América do Sul.

No Brasil, centro de diversidade e domesticação de um grande número de espécies, os estudos de diversidade genética são na sua maioria associados a culturas de *agribusiness* (CLEMENT et al., 2010). Cultivos de raízes e tubérculos, como batata-doce (VEASEY et al., 2008) e inhame (SIQUEIRA; VEASEY, 2009) têm sido negligenciados pela pesquisa tanto para melhoramento como para conservação. A introdução de alguns clones de *D. alata* vindos da África para o território brasileiro, efetuado pelos escravos e mercadores, apresentou-se como uma das mais importantes, senão a maior rota migratória do inhame para a América do Sul. As comunidades tradicionais têm mantido esses tubérculos por décadas e tem perpetuado o hábito de troca de túberas entre famílias e vizinhos. Estes mesmos agricultores têm mantido, e em alguns casos preservado, uma alta diversidade de acessos locais (BRESSAN et al., 2005; VEASEY et al., 2010), embora sejam necessários mais estudos para que se documentem essas observações. No entanto, é possível que alguns acessos locais nessas áreas estejam sendo substituídos por outros de maior produtividade, aumentando desta forma o risco de erosão genética de variedades locais (TAMIRU et al., 2008). A exploração da diversidade em coleções de inhame pode se tornar interessante, no sentido de identificar novos genes, objetivando-se além do melhoramento de algumas variedades, um banco de germoplasma comum (EGESI et al., 2006; TOSTAIN et al., 2007).

No presente estudo, foi observada uma variabilidade significativa, seja do ponto de vista morfológico como a partir do uso de marcadores microssatélites. Estes eram resultados esperados, isto porque, em plantas de propagação vegetativa como o inhame, agricultores com suas contínuas práticas e processos de domesticação, tem tido um papel importante no enriquecimento da diversidade genética entre dioscoreáceas (ZANNOU et al., 2009). No entanto, nosso estudo demonstrou que a diversidade genética entre as regiões foi baixa, consequência do intercâmbio entre agricultores que, em alguns casos são separados por milhares de quilômetros. Muitas vezes, diferentes regiões mantêm os mesmos acessos contendo uma grande proporção dos alelos. Analisando dentro de regiões a diversidade foi alta, ou seja, dentro de cada região diferentes variedades foram mantendo uma vasta gama de alelos.

Poucos estudos foram realizados até o momento com relação à diversidade genética em acessos de *D. alata*, sendo a maior parte realizada com o marcador AFLP (amplified fragment length polymorphism), com o objetivo de estudar sua relação com as outras espécies de *Dioscorea* (MALAPA et al., 2005; TAMIRU et al., 2007). Um dos poucos estudos realizados com microssatélites foi o de Obdiegwu et al. (2009b), observando um total de 97 alelos detectados em 89 acessos originados de nove países africanos, com uma média de 7,46 alelos por loco. No presente estudo foram identificados 176 alelos em cinco regiões do Brasil. Curiosamente, nosso valor médio do PIC por regiões, 0,65, foi o mesmo valor obtido por Obdiegwu et al. (2009b). Esses autores apontam a Nigéria como tendo uma alta diversidade gênica, sugerindo que este país é um centro regional de diversidade da cultura. No presente estudo, baseado nos resultados do índice de Shannon, do número de alelos e valor do PIC, poderemos propor que a região Sudeste seja um importante centro regional de diversidade da espécie no Brasil. Acredita-se que a esta região tenha sido a região onde a espécie *D. alata* tenha sido introduzida no país. O estado de São Paulo foi um local de grande movimentação de escravos, usados como mão de obra em plantio de café e cana de açúcar. Após a abolição da escravatura e com a formação de comunidade quilombolas e a miscigenação com outras culturas, o inhame se manteve sob cultivo, em áreas de roçado e quintais da região. Na década de 40 e 50, muitas culturas hortícolas foram difundidas pelo Instituto Agronomico (IAC). Com relação ao inhame (*Dioscorea alata*) destaca-se a difusão de clones com resistência às doenças fungicas, particularmente devido à requeima foliar (*Curvularia maculans*), a qual dizimou as plantações desta hortícola no estado de São Paulo. Neste contexto, o clone Florida (SRT 29, introduzido de

Porto Rico) agradou os agricultores pela resistência às doenças e pela produtividade elevada, o que favoreceu a expansão da cultura no estado e no Brasil (FELTRAN, comunicação pessoal).

6.4.3 Estrutura genética

A análise da estrutura populacional no presente estudo não apresentou nenhuma estruturação evidente e revelou um alto grau de mistura entre as cinco regiões analisadas, sugerindo um alto grau de intercâmbio genético entre as regiões. Este foi um resultado esperado, visto que o inhame, como outras espécies de propagação vegetativa, é manejado por agricultores que usam a prática de troca de túberas entre vizinhos, o que pode levar a uma mistura de genótipos. Devemos destacar que a diversidade do inhame é resultado de práticas culturais, sociais e de uma dinâmica econômica encontrada entre comunidades tradicionais. Grupos étnicos manejam essa diversidade de diferentes formas, dependendo do seu passado histórico e do contexto onde estão inseridos. Seja de uma escala local ou regional, as túberas de inhame podem atingir grandes distâncias, a partir do seu local de origem, graças aos 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 usar as túberas como presente entre amigos e familiares, muito comum em sociedades tradicionais.

Chaïr et al. (2005) observaram que, a partir de uma determinada localidade, alguns agricultores podem coletar diferentes túberas, o que pode corresponder a diferentes genótipos, colocando ambos simultaneamente no mesmo processo de domesticação. Consequentemente, após algum tempo, esses agricultores não conseguem mais identificar cada clone separadamente. Esta prática leva ao cultivo de diferentes clones da mesma espécie, porém de origens desconhecidas.

Como observado no norte de Benin, África, por Baco et al. (2007), a melhoria de estradas e acessos entre regiões nos últimos anos, permitiu um maior intercâmbio de materiais genéticos. No passado muitos agricultores no Brasil estavam geograficamente isolados. Contudo, nos dias de hoje, os cultivares não são apenas guardados e consumidos por esses agricultores locais e tradicionais; essas túberas podem ser levadas a grandes distâncias de suas origens pelos fluxos migratórios, graças as novas facilidades proporcionadas pelas melhorias das vias e transportes.

Analizando 89 acessos de *D. alata* de nove países africanos, Obidiegwu et al. (2009b) não encontraram nenhuma relação entre a similaridade desses acessos e suas áreas geográficas de origem. Zannou et al. (2009), estudando outras espécies de inhame (*D. cayenensis*-*D. rotundata*) também observou que algumas variedades eram distribuídas aleatoriamente e não apresentavam

nenhuma relação com suas regiões de coleta. A existência de alto polimorfismo distinguindo variedades locais é apresentada em outros estudos, contudo, ambos refletem uma ausência de estrutura espacial geográfica entre eles, o que suporta o principal resultado desta presente análise. Nossa interpretação está de acordo com outros trabalhos que se basearam em dados morfológicos, isoenzimáticos e outros marcadores moleculares (LEBOT et al., 1998; MALAPA et al., 2005; TAMIRU et al., 2007).

Outro dado relevante do estudo é a ausência de uma clara divisão entre os acessos comerciais e locais, conclusão essa suportada pela análise de agrupamento (Figura 19). Os acessos comerciais usados no presente estudo foram obtidos em feiras e comércio local (o maior grupo de acessos oriundo do Estado de São Paulo). Estes pequenos mercados compram as túberas, na grande maioria dos casos do CEASA (Central de Abastecimento e Distribuição) localizado em vários municípios do Brasil, e esporadicamente, de alguns agricultores tradicionais e locais. Consequentemente, é muito difícil reportar com exatidão a origem de cada acesso comercial. Parte dos acessos comerciais pertence ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), responsável pela introdução de algumas variedades de *D. alata* no país, algumas oriundas da República Democrática do Congo, e outras de Singapura. Usando marcadores microsatélites para o presente estudo, nenhuma clara diferenciação foi observada nestes acessos em relação aos acessos locais, contudo, pequenos agrupamentos com acessos comerciais foram observados.

Quando observamos os valores obtidos pelo cálculo das distâncias genéticas entre as quatro regiões (Tabela 16), destaca-se a maior diferenciação genética de materiais entre as regiões Centro-Oeste e Nordeste, e entre Centro-Oeste e Sul. As tabelas 15 e 16 complementam-se, mostrando que a distância genética entre o Sul e o Centro-Oeste foi de 0,097 e os parâmetros G_{st} , D_m e R_{st} para esta combinação de regiões foram os que se apresentaram valores mais altos. Poderemos supor por estes valores que houve um menor fluxo de acessos entre estas regiões pelos fluxos migratórios. De outra forma, e pelos dados obtidos, podemos supor que rotas migratórias que foram traçadas entre os estados nordestinos e os municípios do Centro-Oeste não tiveram tanta influência para que os acessos fossem muito similares geneticamente, comparativamente a combinação de outras regiões. De fato, é documentado que um importante fluxo de nordestinos para a região de Cuiabá levou a formação de alguns municípios na região, em decorrência, muitos emigrantes trouxeram consigo suas raízes e costumes (CUNHA et al., 2006; FERREIRA, 2011), entre eles túberas de inhame. Uma alta similaridade genética foi observada entre as regiões

Nordeste e Sudeste (apresentada pelos baixos valores dos índices G_{st} , D_m e R_{st} e baixo valor da distância genética) o que deveria presupor de um maior fluxo de nordestinos para os municípios em estudo. É sabido que uma das mais importantes rotas migratórias foi do Nordeste para o Sudoeste, no entanto, esses emigrantes se fixaram na sua maioria em grandes cidades, e as áreas coletadas do sudeste no presente estudo foram localidades afastadas dos grandes centros urbanos. Seria incorreto afirmar que não existem grandes aglomerados agrícolas de povos nordestinos no Sudeste, no entanto, os acessos do Sudeste utilizados em nossas análises pertenciam na totalidade a moradores caiçaras, que mantinham suas roças a mais que uma geração, compartilhando túberas entre e apenas vizinhos mais próximos. Podemos também supor que essas túberas mantidas em roças da região Sudeste, possam ter sido adquiridas em feiras e varejões da região, e que esses pequenos comerciantes possam ter adquirido túberas com origem nordestina. A complexidade dos fluxos migratórios e consequentemente a aquisição de túberas muitas vezes de origem desconhecida, permeiam a discussão sobre a estruturação genética de dioscoreáceas no Brasil.

6.5 Conclusões

Em resumo, os dados apresentados aqui suportam a existência de variabilidade genética de inhame (*D. alata*), mantida por diferentes agricultores em uma vasta região territorial brasileira, mesmo que esses acessos foram e continuam sendo propagados vegetativamente. Uma alta proporção dessa variação ocorre dentro de regiões, possivelmente devido a mutações somáticas desses materiais, mas, sobretudo devido ao manejo e aos sistemas de intercâmbio entre os agricultores. Além disso, o fato desta variabilidade genética não estar estruturada no espaço pode ser atribuída também à prática de intercâmbio de material biológico entre os agricultores.

Um melhor conhecimento das variedades tradicionais torna-se um pré-requisito para melhorar a produção de inhame no Brasil. O estudo aqui apresentado foi gerado com o intuito de poder contribuir para uma melhor compreensão da diversidade de inhame em diferentes regiões do Brasil. Espera-se que a informação contida neste estudo venha a ser de utilidade para programas de melhoramento e conservação da espécie.

Referências

- ALATALO, R.V. Problems in the measurement of evenness in ecology. **Oikos**, Buenos Aires, v.37, p.199–204, 1981.
- ARNAU, G.; NEMORIN, A.; MALEDON, E.; ABRAHAM, K. Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L. (Dioscoreaceae) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.118, p.1239–1249, 2009.
- BACO, M.N.; BIAOU, G.; LESCURE, J.P. Complementarity between Geographical and Social Patterns in the Preservation of Yam (*Dioscorea* sp.) Diversity in Northern Benin. **Economic Botany**, New York, v.61, p.385–393, 2007.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p.314–431, 1980.
- 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.
- CHAÏR, H.; CORNET, D.; DEU, M.; BACO, M.N.; AGBANGLA, A.; DUVAL, M.F.; NOYER, J.L. Impact of farmer selection on yam genetic diversity. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 11, p.2255–2265, 2010.
- CHAÏR, H.; PERRIER, X.; AGBANGLA, C.; MARCHAND, J.L.; DAINOU, O.; NOYER, J.L. Use of cpSSRs for the characterization of yam phylogeny in Benin. **Genome**, Ottawa, v.48, p.674–684, 2005.
- CLEMENT, C. R.; HIROSHI, N.; NODA, S.; URIZZI M.A.L.; GLEISSIMAR, C.S. Recursos Frutícolas na Várzea e na Terra Firme de Onze Comunidades Rurais do Alto Solimões, Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica**, Manaus, v.31, n.3, p.521-527, 2001.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, n.4, p. 299-306, 2001.
- CUNHA, J.M.P. Dinâmica migratória e o processo de ocupação do Centro-Oeste brasileiro: o caso de Mato Grosso. **Revista brasileira de estudos populacionais**, São Paulo, v.23, p.87-107, 2006.
- 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.

ELLSTRAND, NC; ELAM, D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology & Systematics**, Califórnia, v.24, p.217-242, 1993.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, Auckland, v.1, p.47–50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v.131, p.479–491, 1992.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multi-locus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.7, p.574–578, 2007.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (**Phylogeny Inference Package**) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2005.

FERREIRA, A.B. **Sistemas de cultivo do cará *Dioscorea* spp. por pequenos agricultores da Baixada Cuiabana – MT**. 2011. 94p. Tese (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2011.

HANSON, T.R.; BRUNSFELD, S.J.; FINEGAN, B.; WAITS, L.P. Characterization of microsatellite markers for the almendro (*Dipteryx panamensis*), a tetraploid rainforest tree. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.8, p.425–427, 2008.

HASAN, S.M.Z.; NGADIN, A.A.; SHAH, R.M.; MOHAMAD, N. Morphological variability of greater yam (*Dioscorea alata* L.) in Malaysia. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Rome, v.61, p.52–61, 2008.

HOLSINGER K.E.; WEIR, B.S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . **Nature Reviews Genetics**, London, v.10, p.639-650, 2009.

HURLBERT, S. H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, Durham, v.52, p. 577–586, 1971.

JACKSON, L.E; PASCUAL, U.; HODGKIN, T. Utilizing and conserving agrobiodiversity in agricultural landscapes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.121, p.196–210, 2007.

JEFFREY, K.; HARTL, D. L. **A primer of Ecological Genetics**. Editora Sinauer, 2004. 304p.

JOMBART, T. *Adegenet*: a R package for the multivariate analysis of genetic markers **Bioinformatics**, Oxford, v.24, p.1403–1405, 2008.

- KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Wageningen, v.177, p.177:309–334, 2011.
- LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids**. Wallingford, CABI, 2009. 440p. (Crop production science in horticulture series, 17).
- LEBOT, V.; MALAPA, R.; MOLISALE, T.; MARCHAND, J.L. Physico-chemical characterization of yam (*Dioscorea alata* L.) tubers from Vanuatu. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.53, p.1199–1208, 2006.
- LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p.2875–2883, 2003.
- 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**, Dordrecht, v.52, p.919–929, 2005.
- MARTINS, P.S. Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos. In: **Diversidade biológica e cultural da Amazônia**. In: VIEIRA, I.C.G.; SILVA, J.M. C.; OREN, D. C., D'INCAO, M.A. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001. p.369–384.
- MARTIN, F.W.; RHODES, A.M. Intra-specific classification of *Dioscorea alata*. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.54, p.1–13, 1977.
- 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, 2003b.
- MONTALDO, A. **Cultivo de raíces y tubérculos tropicales**. São José: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, 1991. 408p.
- NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.76, p.5269–5273, 1979.
- NEI, M. F-Statistic and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annual Human Genetics**, New York.41, n.10, p.225–233, 1977.
- OBIDIEGWU, J.E.; ASIEDU, R.; ENE-OBONG, E.E.; MUONEKE, C.O.; KOLESNIKOVA-ALLEN, M. Genetic characterization of some water yam (*Dioscorea alata* L.) in West Africa with simple sequence repeats. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v.7, p.132–136, 2009a.

OBIDIEGWU, J.; RODRIGUEZ, E.; ENE-OBONG, E.; LOUREIRO, J.; MUONEKE, C.; SANTOS, C.; KOLESHNIKOVA-ALLEN, M.; ASIEDU, R. Ploidy levels of *Dioscorea alata* L. germplasm determined by flow cytometry. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.57, p.351-356, 2009b.

PEARSE, D. E.; CRANDALL, K.E. Beyond Fst: analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, v.5, p.585-602, 2004.

PEDRALLI, G. Dioscoreaceae e Araceae: aspecto taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa:EMEPA. 2002b. p.37-53.

PEDRALLI, G.; CARMO, C. A.; CEREDA, M.; PUIATTI, M. Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p. 530-532, 2002.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Berlin, v.155, p.945-959, 2000.

PUYVELDE, K.V.; GEERT, A.V.; TRIEST, L. ATETRA, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.10, p.331-334, 2010.

R Development Core Team (2009) **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

RAMBAUT, A. **FigTree** - Tree Figure Drawing Tool, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk>. Acesso em fev. de 2011, 2009.

RODZEN, J.A.; FAMULA, T.R.; MAY, B. Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci. **Aquaculture**, Amsterdam, v.232, p.165-182, 2004.

ROSENBERG, N.A.; MAHAJAN, S.; RAMACHANDRAN, S.; ZHAO, C.; PRITCHARD, J.K.; FELDMAN, M. Clines, clusters, and the effect of study design on the inference of human population structure. **PLoS Genetics**, San Francisco, v.1, n.6, p.70, 2005.

ROSENBERG, N.A. *Distruct*: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.4, p.137-138, 2004.

ROUTLEDGE, R.D. Bias in estimating the diversity of large, uncensused communities. **Ecology**, Durham, v.61, p.276-281, 1980.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.4, p.406-425, 1987.

SANTOS, E.S. dos. **Aspectos básicos da cultura do inhame** (*Dioscorea* spp.). João Pessoa – PB: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158 p.

SEAGRI. **Cultura do cará**. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/cara.htm>>. Acesso em: 28 nov 2008.

SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, A.C.E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.58, p.25-40, 2000.

SHARMA, K.; MISHRA, A.K.; MISRA, R.S. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, p.1018-1022, 2008.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; MARCONI, T.G.; BONATELLI, M.L.; ZUCCHI, M.I.; VEASEY, E.A. Development and characterization of microsatellite markers in water yam (*Dioscorea alata*). **American Journal of Botany**, Ohio, v. 98, p.142-146, 2011

SIQUEIRA, M.V.B.M. Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.29, p.6-20, 2011.

SIQUEIRA, M.V.B.M.; VEASEY, E.A. Raíces y tubérculos tropicales olvidados o subutilizados en Brasil. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, Bogotá, v.3, p.110-125, 2009.

TAMIRU, M.; BECKER, H.C.; MAASS, B.L. Diversity, distribution and management of yam landraces (*Dioscorea* spp.) in Southern Ethiopia. **Genetics Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.55, p.115–131, 2008.

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.

TOSTAIN, S.; AGBANGLA, C.; SCARCELLI, N.; MARIAC, C.; DAINOU, O.; BERTHAUD, J.; PHAM, J.L. Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. **Plant Genetic Resources**, Roma, v.5, p.71–81, 2007.

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.

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

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.

VEASEY, E.A.; BORGES, A.; ROSA, M.S.; QUEIROZ, J.R.; BRESSAN, E.A.; PERONI, N. Genetic diversity in Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Solanales, Convolvulaceae) landraces assessed with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.31, p.725-733, 2008.

WHITLOCK, M.C. G'_{ST} and D do not replace F_{ST} . **Molecular Ecology**, Oxford, v.20, p.1083–1091, 2011.

WHITTAKER, R. H. Dominance and diversity in land plant communities. **Science**, Washington, v.147, p.250–260, 1965.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J.; YE, Z.H.; MAO, J.X. 1997. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. Canada, Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta.

ZANNOU A.; AGBICODO, E.; ZOUNDJIHÉKPON, J.; STRUIK, P.C.; AHANCHÉDÉ, A.; KOSSOU, D.K.; SANNI, A. Genetic variability in yam cultivars from the Guinea-Sudan zone of Benin assessed by random amplified polymorphic DNA. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.8, p.26–36, 2009.

ZANNOU. A.; RICHARDS, P.; STRUIK, P.C. Knowledge on yam variety development: insights from farmers' and researchers' practices. **KM4D Journal**, Utrecht, v.2, p.30–39, 2006.

ANEXOS

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O título deste trabalho é “Importância dos diferentes tipos de inhames/carás plantados em roças e quintais de comunidades tradicionais”. Na Universidade, o título usado é: “Diversidade genética em acessos de inhame (*Dioscorea* spp.) originários de roças de agricultura tradicional e variedades comerciais avaliados por marcadores microsatélites”

Este documento tem como objetivo explicar o que pretendemos fazer aqui e, se vocês concordarem, pediremos para assinarem este documento no final. A participação nesta pesquisa, respondendo às perguntas que faremos, é voluntária. A qualquer momento vocês podem desistir de participar, sem nenhum prejuízo.

O objetivo deste estudo é conhecer e coletar tipos ou qualidades de cará/inhame, para estudo na Universidade. Queremos também estudar como os agricultores usam e manejam esses tipos, como e onde é feito o plantio, os cuidados com as plantas e também entender um pouco da história desses. Para isso vamos perguntar quais os nomes que são dados aos carás, de onde vieram, há quanto tempo vêm sendo plantados, entre outras questões. Para que o estudo seja mais completo, precisamos perguntar um pouco sobre as condições de vida no dia-a-dia de vocês. Assim, iremos perguntar se você é o proprietário do local onde usa para plantar, se é arrendatário, posseiro, etc. Este estudo é importante porque há pouca gente estudando as plantas de inhame/cará e elas merecem maior atenção por parte dos pesquisadores. Além disso, o inhame/cará que vocês plantam têm muitos tipos diferentes e vocês têm um conhecimento muito profundo sobre esses tipos. Nós achamos que esse conhecimento tem que ser mais valorizado.

O que será estudado e de que forma vamos estudar?

Vamos pesquisar que tipos de inhame/cará vocês cultivam ou mantêm em suas roças ou quintais. Além disso, vamos procurar saber como e quando vocês plantam, colhem e fazem a limpeza dos terrenos. E como os tipos de inhame/cará vão se espalhando entre os agricultores. Para sabermos disso vamos visitar você e sua família e anotar informações sobre os inhames/carás. Se for possível gostaríamos de visitar a roça e o quintal, e, com a sua permissão, coletar raízes (as frutas) das plantas de inhame/cará que você tem plantadas ou na roça ou no quintal e também tirar fotografias. As mudas são para plantar na Universidade, que é conhecida como Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba, SP, e no Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, SP. Estes locais são órgãos do governo do Estado de São Paulo que realizam pesquisas agrícolas. O dinheiro que é usado neste estudo é público, e vem de um órgão também do governo, que se chama Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Usaremos plantas dessa coleta para análises em laboratório, pois queremos saber as diferenças entre os tipos. Esta pesquisa não tem fins comerciais. A finalidade é científica e de valorização do conhecimento que vocês têm da lavoura e das plantas. Por isto, queremos contribuir retornando este conhecimento para vocês, em reuniões, palestras ou outras formas que vocês acharem adequadas.

Resultados, forma de divulgação e impactos sociais, culturais e ambientais da pesquisa

Nós vamos escrever o que nós aprendemos aqui com vocês em revistas para divulgar a pesquisa e vamos também dar aulas e palestras sobre isso para os nossos alunos na Universidade e para toda a sociedade. Gostaríamos de, no futuro, retornar os resultados do nosso trabalho em reuniões com a comunidade em que vocês moram para troca de idéias, ou outras formas que vocês acharem conveniente. Se houver alguma informação que vocês desejem manter em segredo, nós não iremos divulgar. Também só colocaremos o nome de vocês ou a foto, em revistas ou livros, se isso for permitido por vocês. Vamos tentar incomodar o mínimo possível nas suas atividades do dia a dia.

Dados para contato

Esta pesquisa está sendo coordenada pela professora Elizabeth e pelo professor Nivaldo, e tem também a participação dos pesquisadores Marcos Vinícius Bohrer Monteiro Siqueira e outros alunos da Universidade. Os nossos dados para contato são:

Prof^a Elizabeth Ann Veasey - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP.
Av. Pádua Dias, 11 - 13400-970 – Piracicaba - SP
Telefone: (19) 3429-4255 – E-mail: eaveasey@esalq.usp.br

Prof. Nivaldo Peroni - Departamento de Embriologia e Genética (BEG)
Universidade Federal de Santa Catarina, Bairro Trindade
CEP 88040-970, Florianópolis, SC.
Fone: (48) 3234-2053 e (48) 9989-1777 - E-mail: peronin@gmail.com

Pelo presente termo, atesto que estou ciente e que concordo com a realização do estudo.

Local:

Data:

Nome:

Assinatura:

ANEXO II - ROTEIROS PARA ENTREVISTAS SOBRE O SISTEMA DE CULTIVO E VARIEDADES

a) Caracterização socioeconômica:

Data da entrevista:_____ Local de ocupação nº:_____.

Município:_____ Bairro:_____

Localização em GPS: _____

1. Nome:_____ 2. Sexo: _____

3. Idade:_____

4. Estado civil:_____ 5. Nº de filhos: _____

5. Residentes: () cônjuge – idade:_____

() filho (s) / homem – idade (s): _____

() filha (s) /mulher – idade (s) :_____

() outros:_____ - idade (s) : _____

_____ - idade (s) : _____

6. Local de nascimento:_____

7. Local de nascimento do cônjuge:_____

8. Tempo de residência no local ou região:_____

9. Local da última procedência _____

10. Tempo de residência do cônjuge no local ou região:_____

11. Relação com a terra / local de ocupação:

() Proprietário. Extensão da área da propriedade:_____

() Roça localizada no interior da propriedade.

() Outra situação:_____

() Caseiro. Extensão da área da propriedade:_____.Extensão da área permitida para o uso do caseiro:_____

() roça própria localizada no interior da propriedade em que é caseiro.

() outra situação:_____

() Posseiro. Extensão da posse:_____.

() roça localizada no interior da própria posse.

() roça localizada fora dos limites da própria posse:_____

() outra situação:_____

() Outros:_____

12. Principal fonte de renda/subsistência: () Aposentadoria () Trabalho temporário:_____

() Trabalho fixo: _____ () Agricultura _____ ()

Outros: _____

b) Caracterização da (s) área (s) de cultivo:

1. Locais de cultivo de cará (inhame):

() Quintal () Roça () Roça e quintal () Outros: _____

2. Tamanho da (s) área (s) de cultivo :

() Quintal: _____ () Roça: _____

3. Disposição das cultivares/variedades:

() Quintal () Consorciadas () Separadas

() Roças () Consorciadas () Separadas

4. Tempo de uso da (s) área (s) de cultivo:

() Quintal: _____

() Roça: _____

5. Nº de pessoas que trabalham / auxiliam na (s) área (s) de cultivo:

() Familiares: _____ () Não familiares: _____

6. Calendário de atividades:

Etapa de manejo	Quintal	Roça
Limpeza/derrubada/roçada		
Queima/coivara		
Capina/ tratos culturais		
Plantio*		
Colheita*		

* As etapas de plantio e colheita serão detalhadas para cada variedade na questão 11.

7. Como é feita a escolha da área de roça? _____

8. Houve diminuição nas atividades agrícolas? Desde quando? _____

Especificar _____

9. Por quanto tempo as áreas de roça são deixadas em pousio? _____

Sempre foi assim?: _____

10. Retorna às roças abandonadas? Por quê? _____

c) *caracterização da diversidade (variedades)*

11. Diversidade de cará (inhame) presentes na (s) área (s) de cultivo e calendário de plantio e colheita.

Nome da Variedade:	Quintal	Roça	P ¹	C ²	Usos	Produção
1) _____	()	()	_____	_____	_____	_____

Origem desta variedade: _____

Qual a origem do nome? _____

Há quanto tempo planta esta variedade? _____

Porque planta esta variedade? _____

2) _____	()	()	_____	_____	_____	_____
----------	-----	-----	-------	-------	-------	-------

Origem desta variedade: _____

Qual a origem do nome? _____

Há quanto tempo planta esta variedade? _____

Porque planta esta variedade? _____

3) _____	()	()	_____	_____	_____	_____
----------	-----	-----	-------	-------	-------	-------

Origem desta variedade: _____

Qual a origem do nome? _____

Há quanto tempo planta esta variedade? _____

Porque planta esta variedade? _____

¹P = época de plantio; ²C = época de colheita

12. Por que planta mais de uma variedade? _____

13. Já observou florescimento e frutificação nas variedades de inhame/cará? Em quais variedades?

14. Já observou germinação de semente nessas variedades? Em quais variedades?

15. Qual o modo de propagação utilizado? _____

16. Houve variedades de inhame/cará que plantou no passado e não planta mais? Por quê? _____

17. Aumentou a proporção de alguma variedade? Por quê? _____

18. Usa insumos ou implementos agrícolas? Quais? _____

ANEXO III - FICHA DE COLETA DE INHAME/CARÁ

Data: ____/____/____ **GPS:** _____

Município/Estado: _____

Comunidade/Localidade/Cidade: _____

Nome do Produtor: _____

Nome Popular da Variedade: _____

Espécie: *D. cayenensis* () *D. alata* () *D. bulbifera* () *D. trifida* ()

ANEXO IV – PROTOCOLO PARA CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA

Digestão

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

Em um eppendorf de 1,5 mL:

Água MilliQ	50 µL
Tampão*	10 µL
Espermidina (40 mM)	10 µL
Enzima <i>Rsa</i> I (10 U/µL)	5 µL
DNA (250 ng/µL (= 5 µg))	25 µL

Total: 100 µL

Incubou-se por 3h a 37°C.

Para obter um melhor resultado, colocou-se metade do volume (2,5 µL), incubou-se por 3h, colocou-se a outra metade de enzima e incubou-se por mais 3h.

Controle:

Aplicou-se 10 µL da digestão + 2 µL stop em um gel de agarose 1% TAE 1X (70V). Corou-se em brometo de etídeo por 20 min. Foi observado um *smear* uniforme entre 700 e 1200 pb.

* Diferentes fabricantes de enzimas de restrição recomendam condições de digestão significativamente distintas, mesmo para as mesmas enzimas. É recomendado seguir as instruções do fabricante que acompanham as enzimas. Normalmente cada enzima (ou um conjunto de enzimas) possui um tampão de reação específico. Tampões de diferentes enzimas diferem principalmente na concentração de NaCl na solução, mas também apresentam diferenças na concentração de Tris-HCl, KCl e MgCl₂. Os tampões são preparados com a intenção de se obter o máximo da atividade enzimática.

Ligação de adaptadores

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

*Rsa*21 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3'

*Rsa*25 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'

Reação:

Água MilliQ	12 µL
Tampão 5X	5 µL
<i>Rsa</i> 21 (10 µM)	1,5 µL
<i>Rsa</i> 25 (10 µM)	1,5 µL
T4 DNA ligase (1U/µL)	2 µL
DNA digerido	3 µL
Total:	25 µL

Incubou-se por 2h a 20°C (termociclador)

Quando é digerido o DNA com uma enzima de restrição, existe sempre uma ponta 3' e outra 5'. Essa orientação é dada pelo grupo final da sequência, ou seja, a ponta 3' tem sempre um grupo OH e a porção 5' sempre um grupo fosfato. Portanto, a ligação sempre ocorre de uma ponta 3' com outra 5'. Dessa maneira, o grupo fosfato está na região indicada como 5' e o grupo OH na região indicada como 3'. Para que a ligação ocorra, devem-se ter os respectivos grupos fosfato e OH nas pontas, a ligase (enzima), o magnésio (co-fator) e ATP (a ligase é ATP dependente, não ocorre ligação sem ATP). Finalmente, o magnésio e o ATP vêm no tampão da ligase. O esquema da ligação dos adaptadores ao fragmento é apresentado da seguinte forma:

Pré-Amplificação via PCR

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

Reação:

Água MilliQ	27,5 µL
Tampão 10X	5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µL

dNTP (2,5 mM)	4 µL
<i>Rsa</i> 21 (10 µM)	2 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase (= 3U)	5 µL
Ligação	5 µL

Total: 50 µL

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:

Aplicou-se 10 µL da amplificação + 2 µL stop em um gel de agarose 1% TAE 1x (110V). Corou-se em brometo de etídeo por 20 min.

OBS: Observou-se um *smear* de 300 a 1200 pb; com o aumento do número de ciclos, há o aumento da redundância.

Purificação

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

Purificou-se o restante da amplificação (aproximadamente 40 µL) usando o kit “Quiaquick PCR purification kit” (QIAGEN Cat. # 28104). Todas as centrifugações foram realizadas a 12000-13000 rpm.

1. Adicionou-se 5 volumes de tampão PB a 1 volume de amostra de PCR e misturou-se.

NOTA: Se a mistura estiver laranja ou violeta, adicione 10 µL de acetato de sódio 3M, pH 5.0 e misture. A mistura vai se tornar amarela.

Volume de PCR (40 µL). Volume de tampão PB (200 µL).

2. Colocou-se a coluna no tubo coletor de 2 mL.

3. Para ligar o DNA, aplicou-se a amostra na coluna e centrifugou-se por 1 min.

4. Descartou-se a solução do tubo coletor. Colocou-se a coluna no mesmo tubo coletor.

5. Para lavar, adicionou-se 0,75 ml de tampão PE à coluna e centrifugou-se por 1 min.

6. Descartou-se a solução do tubo coletor. Colocou-se a coluna no mesmo tubo coletor. Centrifugou-se por mais 1 min para garantir que todo o etanol fosse descartado.

7. Colocou-se a coluna em um tubo novo de 1,5 ml.

8. Para eluir o DNA, adicionou-se à coluna 50 µL de água milliQ no centro da membrana e centrifugou-se por mais 1 min.

9. Repetiu-se o passo anterior para garantir a completa eluição do DNA ligado à coluna.

Seleção de fragmentos contendo microssatélites

Objetivo: Selecionar os fragmentos que contêm microssatélites.

1º: Prepararam-se as beads (Figura 13):

1. Ressuspendeu-se os 600 µL de “esferas magnéticas” por agitação.
2. Magnetizou-se por 30s e, com cuidado, aspirou-se o sobrenadante.
3. Adicionou-se 300 µL de SSC 0,5X, ressuspendeu-se, magnetizou-se, e descartou-se o sobrenadante.
4. Repetiu-se a etapa anterior 3 vezes.
5. Ressuspendeu-se em 100 µL de SSC 0,5X (com a p200).

2º: Preparo do DNA purificado:

1. Juntou-se 400 µL de água MilliQ aos 100 µL de DNA purificado.
2. Incubou-se a 95°C no banho por 15 min.
3. Adicionou-se 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. Deixou-se à temperatura ambiente por 20 min, agitando lentamente a cada 2 min (nota: a agitação é muito importante nesta fase!).
5. Misturou-se os 100 µL de esferas 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. Incubou-se por 10 min à temperatura ambiente agitando suavemente o tempo todo. (Apenas rolar os tubinhos entre os dedos).
7. Magnetizou-se por 30s e aspirou-se o sobrenadante.
8. Ressuspendeu-se em 300 µL de SSC 0,1X (nota: sempre trocar a ponteira para não contaminar o SSC).
9. Repetiu-se as duas etapas anteriores 3 vezes.
10. Ressuspendeu-se em 100 µL de água, magnetizou-se e esperou-se 30s.
11. Reservou-se o sobrenadante em um eppendorf e ressuspendeu-se mais uma vez com 150 µL de água. Juntaram-se as duas partes (250 µL) e conservou-se a -20°C.

Amplificação dos fragmentos selecionados

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

Reação:

Água MilliQ	51,5 µL
Tampão de PCR 10X	10 µL
MgCl ₂ (25 mM)	6 µL
dNTP (2,5 mM)	8 µL
<i>Rsa</i> 21 (10 µM)	4 µL
<i>Taq</i> 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:

Aplicou-se 10 µL da reação de amplificação + 2 µL stop em um gel de agarose 1% TAE 1x (70V).

Corou-se em brometo de etídeo por 20 min.

Clonagem em um vetor pGEM-T

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

Em um eppendorf de 1,5 ml:

Água MilliQ	1,5 µL
Tampão 2X	5 µL
Plasmídeo	1 µL
Produto de amplificação	1,5 µL
Ligase	1 µL
Total:	10 µL

ou

Água MilliQ	2 µL
Tampão 2X	10 µL

Plasmídeo	1 μ L
Produto de amplificação	6 μ L
Ligase	1 μ L
Total:	20 μ L

Incubou-se *overnight* a 4°C (termociclador ou geladeira).

Transformação em xli-blue

Objetivo: Transformar células de *E. coli* com o produto de clonagem para proporcionar a amplificação do inserto. Fazer um controle com 30 ng de vetor não ligado.

Protocolo de Transformação (baseado no protocolo de Avi Levy (1991), comunicação pessoal)

- 1) Retirou-se as células competentes do freezer -80°C (alíquotas de 100 μ L) e colocou-se em isopor com gelo dentro do fluxo (nota: cuidado ao tirar as bactérias competentes do freezer: colocá-las imediatamente no gelo, pois, ao descongelarem, perdem a competência);
- 2) Misturou-se 8 μ L da ligação com 32 μ L do transfo buffer (manter sempre a relação de 1:4) e adicionou-se esse volume a um tubo contendo 100 μ L de células competentes, ressuspendeu-se cuidadosamente com a ponteira e manteve-se no gelo por 20 min;
- 3) Tirou-se do gelo e colocou-se num rack a temperatura ambiente por 10 min;
- 4) Adicionou-se 450 μ L de SOC e incubou-se a 37°C por 50 min;
- 5) Ressuspendeu-se com uma ponteira e plaqueou-se 80 μ L por placa grande contendo meio LB + ampicilina (preparada a 50 mg/mL), 30 μ L de IPTG + 30 μ L de X-Gal. Colocou-se um volume de cada (bactéria, IPTG e X-Gal) em uma porção oposta da placa e espalhar conjuntamente. Deixou-se secar e colocou-se na estufa até o dia seguinte;
- 6) Depois das colônias terem crescido *overnight* (18 a 20h) a 37°C, colocou-se em geladeira para ficarem azuis, após o repique. Selecionaram-se as colônias brancas.

Manutenção dos clones

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

Utilizou-se placas ELISA com fundo em U, contendo 200 μL de meio 2YT-HMFM + ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) por poço. As colônias brancas foram repicadas com a ajuda de palitos estéreis. Deixou-se crescer *overnight* a 37°C.

Deixou-se em freezer -20°C por 30 min e então, armazenou-se em freezer -80°C. As placas ELISA com fundo em U foram devidamente etiquetadas.

Amplificação dos insertos clonados

Objetivo: Verificar se os clones transformados contêm os insertos.

Dentro do fluxo laminar: Retiraram-se as placas com os clones a serem amplificados deixando-as descongelar em gelo; preparou-se o mix da reação de PCR e aliquotou-se nas microplacas; por último colocou-se DNA (2 μL do material estocado e saído do freezer, o qual deve estar descongelado para não se pegar gelo ou debri celular).

Reação:

Água MilliQ	13,25 μL
Tampão 10X	2,5 μL
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 μL
dNTP (2,5 mM)	2,0 μL
<i>Rsa</i> 21 (10 μM)	1,25 μL
<i>Taq</i> DNA polimerase	2,0 μL
DNA clone	2,0 μL
Total:	25 μL

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

Controle:

Aplicou-se 18 μL da amplificação + 3 μL stop em um gel de agarose 1,5% TAE 1X (100V por 1h e 30 min). Corou-se em brometo de etídeo por 20 min.

Inoculação e extração plasmidial

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

1) Colocou-se 1 ml de meio Circle Grow contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina em cada pocinho da microplaca;

- 2) Inoculou-se 2 μL dos clones individuais com o auxílio de pipeta multicanal. Selou-se a placa com adesivo e furou-se em cima com uma agulha para aeração durante o crescimento;
- 3) Incubou-se a 37°C (shaker), 300 rpm, durante 22h;
- 4) Trocou-se o adesivo da placa e centrifugou-se por 6 min, 3000 rpm, para sedimentar as células;
- 5) Descartou-se o sobrenadante e manteve-se a placa invertida sobre papel absorvente por 1 min;
- 6) Adicionou-se a cada pocinho 240 μL de GTE, selou-se a placa com adesivo e ressuspendeu-se as células agitando no vortex por 2 min;
- 7) Centrifugou-se por 6 min a 4000 rpm (enquanto isso, colocou-se 5 μL de RNase 10 mg/mL em placa com fundo em U);
- 8) Descartou-se o sobrenadante;
- 9) Adicionou-se a cada pocinho 60 μL de GTE, selou-se a placa com adesivo para etanol e agitou-se no vortex por 5 min.;
- 10) Transferiu-se 60 μL de cada suspensão de células para placa com fundo em U contendo RNase;
- 11) Adicionou-se a cada pocinho 60 μL de NaOH 0,2M – SDS 1% , selou-se a placa com adesivo e misturar 10x por inversão. Incubou-se 10 min à temperatura ambiente (nota: começar a marcar o tempo quando colocar a solução na primeira fileira);
- 12) Colocou-se na centrífuga e deu-se um spin (até 1000 rpm);
- 13) Adicionou-se a cada pocinho 60 μL de KOAc 3M (estocado a 4°C), selou-se a placa com adesivo e misturou-se 10x por inversão;
- 14) Colocou-se na centrífuga e deu-se um spin (até 1000 rpm);
- 15) Removeu-se o adesivo e incubou-se em estufa a 90°C por exatos 30 min;
- 16) Esfriou-se a placa em gelo por 10 min e centrifugou-se por 4 min a 4000 rpm;
- 17) Fixou-se com fita adesiva uma placa filtro no topo de uma placa de fundo em V, atentando para o alinhamento dos pocinhos;
- 18) Transferiu-se todo o volume para a placa filtro e centrifugou-se por 4 min a 4000 rpm, 20°C;
- 19) Removeu-se a placa filtro e adicionou-se ao filtrado 110 μL de isopropanol;
- 20) Selou-se a placa com adesivo e misturou-se 20x por inversão;
- 21) Centrifugou-se por 45 min a 4000 rpm, 4°C;
- 22) Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se 160 μL de etanol 70% gelado;
- 23) Centrifugou-se por 10 min a 4000 rpm, 4°C, e descartou-se o sobrenadante;

24) Inverteu-se a placa sobre papel absorvente, colocou-se invertida na centrífuga e deu-se um spin até 300 rpm (aceleração e desaceleração baixas).

25) Deixou-se secar por 60 min à temperatura ambiente (ao abrigo da luz);

26) Ressuspendeu-se em 30 μ L de água MilliQ (*overnight*).

Controle:

Aplicou-se 3 μ L plasmídeo + 3 μ L água + 5 μ L stop em um gel de agarose 1 % TAE 1x. Corou-se em brometo de etídeo por 20 min.

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 μ L
Tampão Save Money	2 μ L
Primer (5 pmol/ μ L)	1 μ L
DNA plasmídeo	4 μ L
Big Dye (vs.3.1)*	2 μ L

Total: 10 μ L

*(Nota: A versão do Big Dye está associada ao tipo de matriz usada no sequenciamento). Ciclos: 96°C por 2 min, seguido de 26 ciclos (96°C 45s, 50°C 30s, 60°C 4 min).

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) Adicionou-se 80 μ L de isopropanol a 65% (Big Dye vs. 3) ou isopropanol 75% (Big Dye vs. 2) a cada pocinho;

2) Deixou-se em repouso durante 15 min à temperatura ambiente (ao abrigo da luz);

3) Centrifugou-se por 45 min a 4000 rpm, 20°C;

- 4) Descartou-se o sobrenadante no papel toalha, cuidadosamente;
- 5) Adicionou-se 200 μ L de etanol 70% gelado;
- 6) Centrifugou-se por 5 min a 4000 rpm, 20°C;
- 7) Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante em papel toalha;
- 8) Deu-se um spin até 250 rpm, com a placa invertida em papel toalha;
- 9) Selou-se a placa por uma hora em lugar arejado e ao abrigo da luz;
- 10) Ressuspendeu-se o DNA em 4 μ L de tampão de corrida (Blue Dextran + formamida), misturou-se e desnaturou-se por 3 min a 95°C.

Análise de sequências utilizando softwares livres

Exclusão das sequências do clone e dos adaptadores

1. Ainda no Chromas, localizou-se a sequência do adaptador da extremidade 5' através da opção *Find* no menu *Edit*. Copiou-se a sequência GAATTCACCGATC* no campo *Find*: e escolheu-se a opção *Find First*. O nucleotídeo marcado no cromatograma indicava o início da sequência buscada.
2. Posicionou-se o cursor do mouse no último nucleotídeo da sequência GAATTCACCGATC e clicou-se selecionando o C. No menu *Edit* selecionou-se a opção *Set Left Cutoff* para marcar a parte esquerda da sequência correspondente aos adaptadores e vetor.
3. Localizou-se a sequência do adaptador da extremidade 3' através da opção *Find* no menu *Edit*. Copiou-se a sequência GATCGGTGAATTC* no campo *Find*: e escolheu-se a opção *Find First*. O nucleotídeo marcado no cromatograma indicava o início da sequência buscada.
4. No menu *Edit* selecionou-se a opção *Set Right Cutoff* para marcar a parte direita da sequência correspondente aos adaptadores e vetor.
5. No menu *Edit* selecionou-se a opção *Delete Cutoff Sequences* as sequências correspondentes aos adaptadores e vetor.
6. No menu *File Edit* selecionou-se a opção *Export* para obter a sequência do inserto no formato FASTA

Construção de primers nas regiões flanquedoras dos microsatélites

1. Entrou-se no Word e abriu-se o arquivo FASTA obtido na etapa anterior. Copiou-se a sequência.
2. Abriu-se o programa GeneRunner. Em *File* selecionou-se *New Nucleic Acid Sequence*. Incluiu-se a sequência nesta janela.
3. Com o mouse, selecionou-se a região de microsatélite. Isto indicou que a região selecionada estava contida no produto de PCR.
4. Abriu-se a janela de análise de PCR selecionando a função *Analysis* no menu principal, *Nucleic acid* e *PCR primers*. OBS: a janela também pode ser aberta ao clicar no botão PCR na barra de ferramentas.
5. Nesta janela foram inseridos os parâmetros para a busca por primers. Os principais parâmetros estão explicados a seguir.
 1. *Primer length*: estabelece o intervalo de tamanho dos primers.
 2. *Primer Tm*: estabelece os limites da Tm (ponto de fusão) para os primers. Tm é a temperatura na qual 50% do oligonucleotídeo já formou um duplex por hibridização com a fita molde.
 3. *Primer Tm dif <=*: é a diferença máxima nas Tms de um par de primers.
 4. *Primer %GC*: estabelece o intervalo para o conteúdo (porcentagem) de GC nos primers. A %GC tem um efeito indireto na Tm. Maiores concentrações de GC resultam em uma Tm mais alta.
 5. *3' Nucleotides*: determina qual(is) base(s) deverão estar presentes na extremidade 3' dos primers.
 6. *Salt con (mMol)*: concentração de sal que será utilizada na reação de PCR. A concentração padrão é 50 mM, que é a concentração de sal recomendada para a maioria das reações de PCR.
 7. *Search region*: limita a busca por primers a uma região definida, estabelecendo a primeira base da região (*From base #*) e a última (*To base #*).
 8. *Product must include region*: região alvo para a amplificação que deverá estar inteiramente contida no produto de PCR. Estabelece o início da região (*From*) e o final (*To*). Se uma região for selecionada na sequência, os valores são automaticamente preenchidos.
 9. *Product attributes*: limita o tamanho (*Product length*), a Tm (*Product Tm*) e a %GC (*Product %GC*) do produto gerado pelos primers selecionados.

10. Discard primers with: permite a seleção de filtros para prevenir a escolha de primers que possam formar homo-dímeros, hetero-dímeros, alças, grampos, etc.
7. Após a entrada de todos os parâmetros, selecionou-se OK para iniciar a análise. Aparecerá uma janela mostrando o número de primers encontrados e as rejeições de acordo com cada parâmetro. Selecione OK.
8. Uma janela mostrando os primers encontrados será aberta. Esta janela mostrará a posição, Tm e %GC de cada primer, bem como a diferença da Tm entre eles e o tamanho do produto. Selecionou-se a opção OLIGOS para examinar as informações referentes ao par de primers escolhidos.