

# VARIABILIDADE GENÉTICA DE ETNOVARIEDADES DE MANDIOCA, AVALIADA POR MARCADORES DE DNA

Gilda Santos Mühlen<sup>1</sup>; Paulo Sodero Martins<sup>2</sup>; Akihiko Ando<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduada do Depto. de Genética - USP/ESALQ.

<sup>2</sup>Depto. de Genética - USP/ESALQ - in memoriam.

<sup>3</sup>Depto. de Genética - USP/ESALQ, C.P. 83 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP.

\*Autor correspondente <ando@cena.usp.br>

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi quantificar a variabilidade genética de etnovariedades ("folk varieties") de mandioca e examinar a distribuição desta variabilidade entre grupos de etnovariedades de diferentes locais de origem e tipos. Foram escolhidas 54 etnovariedades de mandioca originárias de quatro regiões brasileiras: 45 etnovariedades da Amazônia (23 do Rio Negro, 6 do Rio Branco e 16 do Rio Solimões) e 9 do litoral sul do Estado de São Paulo. A variedade moderna Mantiqueira<sup>1</sup>, de ampla distribuição mundial, também foi incluída. Destas, 38 variedades eram mandiocas bravas e 17 de mesa (aipins ou macaxeiras). Foram utilizados três tipos de marcador de DNA: RAPD, AFLP e microssatélites. A análise dos resultados consistiu na descrição do padrão de bandas, cálculo de índices de similaridade (Nei & Li; 1979) e análise de coordenadas principais (PCoA), para cada tipo de marcador. Para os locos de microssatélites foram calculados também: heterozigotidade, índices de diversidade (DI, de Weir) e coeficientes de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ). A variabilidade genética mostrou-se mais concentrada dentro de regiões do que entre regiões ( $G_{ST} = 0,07$ ). A heterozigotidade média foi de 56%. Os índices médios de similaridade entre variedades variaram em função do tipo de marcador:  $S = 0,89$  para RAPD,  $S = 0,85$  para AFLP e  $S = 0,59$  para microssatélites. Análises de coordenadas principais mostraram agrupamentos separando as variedades de mesa das bravas. Palavras chave: *Manihot esculenta*, aipim, marcador, diversidade genética

## GENETIC DIVERSITY OF CASSAVA FOLK VARIETIES ASSESSED BY DNA MARKERS

**ABSTRACT:** The objective of this work was to quantify the genetic diversity among cassava folk varieties as well as to examine the distribution of the genetic diversity among varieties of different origin and type. Fifty-four cassava varieties were chosen from 4 Brazilian regions: 45 of the Amazon basin (23 from River Negro, 6 of the River Branco and 16 of the River Solimões) and 9 of the south coast of the São Paulo State, Brazil. The modern variety Mantiqueira was also included as a reference. Among these, 38 were bitter varieties and 17 sweet. Three different types of DNA markers were used: RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism) and microsatellites. Analysis of the results consisted of a description of band patterns, a calculation of similarity indexes (Nei & Li) and a principal coordinate analysis (PCoA) for each marker type. Heterozygosity, diversity indexes (DI, Weir) and genetic differentiation coefficients ( $G_{ST}$ ) were calculated for the microsatellite loci. Genetic variability was more concentrated within regions, then among regions ( $G_{ST} = 0.07$ ). Mean heterozygosity was 56%. Mean similarity indexes were dependent on the marker used:  $S = 0.89$  for RAPD,  $S = 0.85$  for AFLP and  $S = 0.59$  for microsatellites. PCoA analysis revealed groups, distinguishing bitter from sweet varieties.

Key words: *Manihot esculenta*, cassava, marker, genetic diversity

## INTRODUÇÃO

A invenção e o desenvolvimento da agricultura criaram uma ampla diversidade entre as espécies escolhidas para domesticação (Brush et al., 1981). Essa diversidade se expressa, entre outras maneiras, no grande número de variedades que as espécies cultivadas apresentam. Contam-se em centenas ou milhares as variedades de arroz, centeio, cevada, trigo, sorgo, milho, feijão, batata, inhame, goiaba, uva, para citar algumas (Cleveland et al., 1994; Struss & Plieske, 1998; Cattantoupace et al., 1998; Brush et al., 1981; Hamon & Toure, 1990).

No entanto, os avanços tecnológicos, a mecanização, o crescente uso de insumos e os programas de melhoramento genético das espécies cultivadas, que caracterizam o modelo da agricultura moderna, também levaram a uma redução drástica na diversidade genética das principais culturas (Cleveland et al., 1994).

O estudo dos sistemas agrícolas tradicionais, em que a geração e manutenção de diversidade inter e intra específica são uma constante, é de grande importância para orientar programas efetivos de conservação de germoplasma.

Variabilidade especialmente grande é encontrada, ainda, entre povos indígenas no continente americano,

<sup>1</sup>Outras denominações da cultivar Mantiqueira: IAC 24-2, CMC 40 e MCol 1468.

com destaque para a bacia Amazônica. A preservação desta variabilidade está relacionada a características culturais destes povos e ao tipo de manejo agrícola prevalente (Kerr & Clement, 1980; Salick et al., 1997; Boster, 1985; Peroni, 1998; Martins, 1994).

Para a maior parte das comunidades indígenas remanescentes, assim como para outros agricultores tradicionais, no Brasil, a mandioca é a espécie cultivada mais importante. Sua domesticação ocorreu no continente sul americano, onde vem sendo cultivada há alguns milhares de anos (Olsen & Schaal, 1999; Allem, 1987). A partir da colonização européia, no século XVI, a cultura da mandioca se expandiu para a África e Ásia, onde se tornou a base da alimentação para milhões de pessoas.

A diversidade genética da mandioca tem sido caracterizada em termos de número de variedades cultivadas. Estima-se em cerca de 7000, o número de variedades encontradas em todo o mundo, em sua maioria etnovarietades ("folk varieties"), mantidas por agricultores tradicionais (Boster, 1985; Salick, et al., 1997; Kerr & Clement, 1980; Hershey, 1994; Emperaire et al., 1998).

Estudos mais detalhados, em função de características morfológicas, caracteres agrônômicos e bioquímicos, isoenzimas e marcadores de DNA, quantificaram e mostram alguns aspectos da distribuição da variabilidade genética da cultura (Rogers & Fleming, 1973; Cury, 1993, 1998; Colombo, 1997; Colombo & Valle, 1998; Colombo et al., 1998; Roa, 1996; Carvalho et al., 1998; Sambatti, 1998; Peroni, 1998).

Um aspecto interessante sobre a organização do germoplasma da mandioca é que, apesar de não haver caracteres morfológicos especificamente associados à distinção entre mandioca brava e mandioca de mesa (macaxeira ou aipim), conjuntos de marcadores de DNA ou morfológicos, podem estabelecer uma distinção entre estes dois grupos.

Esta separação poderia ser resultado de diferentes vias de domesticação das mandiocas bravas e de mesa (Rogers & Fleming, 1973; McKey & Beckerman, 1993; Dufour, 1988; Renvoize, 1972; Mkumbira et al., 1998a, 1998b; Rosling, 1996; Nye, 1991; Dufour & Wilson, 1996; Emperaire et al., 1998; Pereira & Pinto, 1962; Pereira et al., 1965; Normanha, 1956; Sinha & Nair, 1968; Colombo & Valle, 1998).

O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de etnovarietades de mandioca de diferentes locais de origem e diferentes tipos de uso.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Foram avaliadas 45 etnovarietades de mandioca provenientes da Amazônia, 9 do litoral sul do Estado de São Paulo e uma variedade moderna, a Mantiqueira. As variedades da região amazônica provêm de três sub-

regiões: 23 do Rio Negro, 6 do Rio Branco e 16 do Rio Solimões. Na TABELA 1, as variedades estão agrupadas segundo o local de coleta: roça, comunidade, sub-região, município e Estado.

Todas as variedades do litoral de São Paulo são mandiocas de mesa. Das variedades da Amazônia, 7 são mandiocas de mesa e 38 são mandiocas bravas.

As etnovarietades foram coletadas em roças de agricultores tradicionais, indígenas ou caiçaras. De cada variedade identificada pelo agricultor foram cortadas manivas de uma ou duas plantas. Apenas uma planta de cada variedade foi usada na determinação das marcas de DNA.

### Extração e amplificação de DNA

A extração de DNA foi feita segundo metodologia descrita por Dellaporta et al. (1983), com modificações (Mühlen, 1999). Foram usados três tipos de marcadores de DNA baseados na amplificação em cadeia por polimerase (PCR): RAPD, AFLP e microssatélites.

Para obtenção de polimorfismos do tipo RAPD, foi seguida a metodologia de Williams et al. (1993), com modificações (Mühlen, 1999). Foram utilizados quarenta iniciadores dos conjuntos OPERON X e OPERON E.

Para obtenção de polimorfismo do tipo AFLP, foi seguida a metodologia de Vos et al. (1995) com modificações (Mühlen, 1999). Foram utilizadas as enzimas EcoRI e MseI. Os iniciadores da amplificação seletiva tiveram como nucleotídeos seletivos: MseI-ACA/EcoRI-CTC, MseI-ACA/EcoRI-CAG, MseI-ACT/EcoRI-CAC e MseI-AGG/EcoRI-CAA.

Para amplificação de microssatélites foi seguida a metodologia descrita por Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) e modificada por Mühlen (1999). Os onze pares de iniciadores foram desenvolvidos especialmente para mandioca (ver seqüências em Chavarriaga-Aguirre et al., 1998). Foram marcados com fluorescência (por Research Genetics ou Perkin-Elmer) e analisados em equipamento ABI-Prism 377 e com os programas GeneScan e Genotyper.

### Análise dos dados

Os fragmentos de DNA amplificados foram computados como presença ou ausência de bandas, para os três tipos de marcador de DNA separadamente. Foram analisadas todas as bandas, tanto polimórficas como monomórficas. Foi estimada a similaridade genética (S) entre as variedades de mandioca de acordo com Nei & Li (1979). Os cálculos foram feitos usando o programa NTSYS (Rohlf, 1992).

A análise de coordenadas principais (PCoA) foi feita no programa FITOPAC, desenvolvido por Shepherd, G. da Universidade de Campinas. A dispersão das variedades de mandioca foi visualizada no plano formado pelas duas primeiras coordenadas principais.

TABELA 1 - Variedades de mandioca.

Identificação	Nome	Estado	Município	Localidade	Uso*
<b>Rio Negro</b>					
DG038	Maniva Inajá	Amazonas	Barcelos	Comunidade Piloto	F
DG039	Macaxeira Branca	Amazonas	Barcelos	Comunidade Piloto	M
DG040	Branquinha	Amazonas	Barcelos	Comunidade Marará - Índios Tukâno	F
DG041	sem nome	Amazonas	Barcelos	Comunidade Marará - Índios Tukâno	F
DG042	Mandioca São João	Amazonas	Barcelos	Comunidade Marará - Índios Tukâno	F
DG043	Pretinha	Amazonas	Barcelos	Comunidade Marará - Índios Tukâno	F
DG044	Mandioca do Antonio	Amazonas	Barcelos	Comunidade Marará - Índios Tukâno	F
DG045	Macaxeira	Amazonas	Barcelos	Comunidade Marará - Índios Tukâno	M
DG046	Orelha de Burro	Amazonas	Barcelos/Anati	Comunidade D. Pedro II	F
DG047	Mamaroca	Amazonas	Barcelos/Anati	Comunidade D. Pedro II	F
DG048	Tartaruga	Amazonas	Barcelos/Anati	Comunidade D. Pedro II	F
DG049	Amarela II	Amazonas	Carvoeiro		F
DG050	Olho Roxo	Amazonas	Carvoeiro		F
DG051	Pretinha	Amazonas	Carvoeiro		F
DG052	Seis Meses	Amazonas	Carvoeiro		F
DG054	Antinha	Amazonas	Carvoeiro		F
DG055	Anará	Amazonas	Carvoeiro		F
DG056	Arapari	Amazonas	Carvoeiro		F
DG058	Amarela I	Amazonas	Carvoeiro		F
DG059	Samuama	Amazonas	Carvoeiro		F
DG060	sem identificação I	Amazonas	Carvoeiro		F
DG061	Macaxeira	Amazonas	Carvoeiro		F
DG062	sem identificação II	Amazonas	Carvoeiro		F
<b>Rio Branco</b>					
DG065	Anará	Roraima	Marará		F
DG067	Roxinha	Roraima	Marará		F
DG068	Macaxeira Pão	Roraima	Castanho		F
DG069	Camarão	Roraima	Castanho		F
DG070	Tala Encarnada	Roraima	Panarica		F
DG073	Socó	Roraima	Panarica		F
<b>Rio Solimões</b>					
DG111	Geoató	Amazonas	Uairini	Comunidade São Sebastião	F
DG112	Pretinha	Amazonas	Uairini	Comunidade São Sebastião	F
DG113	Antinha	Amazonas	Uairini	Comunidade São Sebastião	F
DG114	de semente	Amazonas	Uairini	Comunidade São Sebastião	F
DG115	Maguari	Amazonas	Guarabira	Comunidade São João - Lago Mamiá	F
DG116	Ourinho	Amazonas	Guarabira	Comunidade São João - Lago Mamiá	F
DG118	Macaxeira	Amazonas	Guarabira	Comunidade São João - Lago Mamiá	F
DG138	Antinha	Amazonas	Guarabira	Lago Mamiá	F
DG117	Caneová	Amazonas	Guarabira	Lago Mamiá	F
DG119	Macaxeira	Amazonas	Guarabira	Lago Mamiá	F
DG120	Antinha	Amazonas	Guarabira	Lago Mamiá	F
DG121	Turuna	Amazonas	Guarabira	Lago Mamiá	F
DG122	Marreca (semente)	Amazonas	Guarabira	Lago Mamiá	F
DG123	Antinha x Marreca	Amazonas	Guarabira	Lago Mamiá	F
DG124	Macaxeira	Amazonas	Guarabira	Lago Mamiá	F
DG125	sem identificação	Amazonas		Lago Amanã	F
<b>Litoral SP</b>					
DG126	Aipim Roxo	São Paulo	Cananéia	Dona Saturnina	F
DG127	Aipim Roxo (semente)	São Paulo	Cananéia	Dona Saturnina	F
DG128	Manteiga (aipim)	São Paulo	Cananéia	Dona Saturnina	M
DG129	Aipim Mata Fome	São Paulo	Cananéia	Sr. Natalício	M
DG130	Vassourinha	São Paulo	Cananéia	Sr. Sívio Ramos	M
DG131	Manteiguinha	São Paulo	Cananéia	Sr. Sívio Ramos	M
DG132	Aipim Roxo	São Paulo	Cananéia	Dona Tuca	M
DG133	Manteiga	São Paulo	Ilha Comprida	Comunidade Pedrinhas	M
DG134	Aipim Roxo	São Paulo	Ilha Comprida	Comunidade Pedrinhas	M
<b>IAC</b>					
DG137	Mantiqueira (IAC 24-2)	São Paulo	Campinas	Instituto Agronômico de Campinas	M

(\*) F = Farinha, M = Mesa

Para os microssatélites foram avaliados também a proporção de locos heterozigóticos, índices de diversidade (DI de Weir, 1990) e o coeficiente de diferenciação genética ( $G_{ST}$  de Nei, 1973). Nestes casos, as bandas geradas por cada par de iniciadores foram computadas como alelos, para cada um dos 11 locos de de microssatélites.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Distribuição geral das bandas de RAPD, AFLP e microssatélites

Foram analisadas 339 bandas, sendo 134 de AFLP, 156 de RAPD e 49 de microssatélites. A proporção de bandas polimórficas e monomórficas pode ser vista na TABELA 2.

Os marcadores que apresentaram maior polimorfismo foram os microssatélites, com 97,96% de bandas polimórficas, seguidos dos marcadores de AFLP, com 69,40% de bandas polimórficas e por último os marcadores de RAPD, com 55,80% de bandas polimórficas.

### Distribuição das bandas por grupos de variedades de mandioca

Foram usados dois critérios para agrupamento das variedades de mandioca: local de origem e tipo. Quanto ao local de origem, são quatro grupos: Rio Negro, Rio Branco, Rio Solimões e litoral sul do Estado de São Paulo. Quanto ao tipo são dois grupos: de mesa e bravas.

Analisando a presença e ausência das bandas dentro dos grupos de variedades de mandioca de diferentes regiões de origem, observa-se que nem todas as bandas estão presentes em todos os grupos. A TABELA 3 indica que a ausência de bandas é mais acentuada no grupo de variedades do litoral sul de São Paulo. Das 339 bandas analisadas, 56 (16,52%) estão ausentes neste grupo.

O conjunto de variedades oriundas da Amazônia apresenta praticamente todas as bandas analisadas, faltando apenas 2 bandas (1%). Dentro deste conjunto de variedades, o grupo do Rio Branco tem maior proporção de bandas ausentes: 11% do total de bandas.

O grupo do Rio Negro é o que apresenta menor frequência de bandas ausentes: apenas 4% do total. O grupo do Solimões tem um valor intermediário de bandas ausentes: 8% do total.

Quanto aos dois tipos de mandioca, no grupo das mandiocas bravas estão ausentes 6 bandas (1,77 %) e no grupo das mandiocas de mesa estão ausentes 40 bandas (11,80%).

Observa-se que os padrões de distribuição das bandas presentes e ausentes, obtidos para cada tipo de marcador separadamente, são similares ao descrito para o conjunto de 339 bandas. O número mais alto de bandas ausentes encontrado para os microssatélites, em relação aos valores observados para RAPD e AFLP, se deve à própria natureza deste tipo de marcador (codominante e com locos polialélicos).

De modo geral, os grupos com menor número de variedades foram os que apresentaram maior número de bandas ausentes, o que, em parte, reflete um efeito de

TABELA 2 - Proporção de bandas polimórficas e monomórficas.

Tipo de Marcador	Monomórficas		Polimórficas		TOTAL	
	Número de bandas	%	Número de bandas	%	Número de bandas	%
RAPD	69	44,20	87	55,80	156	100,00
AFLP	41	30,60	93	69,40	134	100,00
Microssatélites	1	2,04	48	97,96	49	100,00
TOTAL	111	32,70	228	67,30	339	100,00

TABELA 3 - Bandas ausentes nos grupos de variedades de mandioca.

Região/Tipo	RAPD		AFLP		Microssatélites		TOTAL		n*
	Número de bandas	%	Número de bandas	%	Número de bandas	%	Número de bandas	%	
V. do Ribeira	21	13,46	17	12,69	18	36,73	56	16,52	9
AMAZÔNIA	1	0,64	1	0,75	0	0,00	2	0,59	45
Rio Solimões	6	3,85	11	8,21	11	22,45	28	8,26	16
Rio Branco	9	5,77	13	9,70	14	28,57	36	10,62	6
Rio Negro	5	3,21	2	1,49	6	12,24	13	3,83	23
De mesa	13	8,33	10	7,46	17	34,69	40	11,80	17
Bravas	2	1,28	3	2,24	1	2,04	6	1,77	38

\* n = número de variedades por local de origem e tipo

amostragem. No entanto, o grupo do litoral sul de São Paulo, com 9 variedades, apresentou, para todos os tipos de marcador, maior ausência de bandas do que todos os outros grupos, inclusive o do Rio Branco, que conta com apenas 6 variedades. Provavelmente isto reflete uma menor variabilidade genética deste grupo de variedades de mandioca oriundas de São Paulo.

#### Análise dos alelos de microssatélites

A TABELA 4 apresenta o número de alelos diferentes de cada microssatélite, por grupo de variedades de mandioca. Observa-se que o número de alelos por loco varia de 2 a 8, com uma média geral de 4,5 alelos por loco.

A frequência de indivíduos heterozigóticos, por loco, varia de 2% para o microssatélite GA013 a 91% para o microssatélite GA131, com média de 56%, no total de 55 variedades (TABELA 5).

O grupo que apresenta maior frequência de genótipos heterozigóticos é o do litoral de São Paulo, com

75% de média para os 11 locos. Segue o grupo do Rio Negro, com 55%, do Rio Branco, com 53% e do Solimões, com 49%. Tomadas em conjunto, as variedades provenientes da Amazônia apresentam frequência média de indivíduos heterozigóticos de 53%.

Quanto à proporção de locos de microssatélites heterozigóticos, por variedade, encontramos um valor mínimo de 23% de locos heterozigóticos nas variedades DG065, DG116, DG122 e DG125 e um máximo de 91% DG045, DG061 e DG068. O valor médio é de 56% (valores não mostrados em TABELA).

#### Índices de diversidade genética para os locos de microssatélites

Na TABELA 6, estão os índices de diversidade (DI) calculados para cada loco de microssatélites, para cada grupo e para o total de variedades. Os valores de DI total se distribuem entre DI = 0,02 e DI = 0,79, com média de DI = 0,55.

TABELA 4 - Número de alelos em 11 microssatélites, por grupo de variedades de mandioca.

Microssatélite	R. Negro	R. Branco	R. Solimões	AMAZÔNIA	V. Ribeira	TOTAL	De mesa	Bravas
GA136	5	3	5	6	3	6	3	6
GA126	5	4	6	6	5	6	5	5
GA012	3	3	3	3	3	3	3	3
GA131	7	5	5	8	3	8	3	8
GA134	3	2	2	3	2	3	2	3
GA013	2	1	1	2	1	2	1	2
GA140	5	5	5	6	4	6	4	6
GA021	4	4	2	6	3	6	3	6
GAGG5	3	3	3	3	2	3	3	3
GA057	4	3	4	4	3	4	3	4
GA016	2	2	2	2	2	2	2	2
TOTAL	43	35	38	49	31	49	32	48

TABELA 5 - Frequência de heterozigotos em 11 microssatélites, por grupo de variedades de mandioca.

Microssatélite	R. Negro	R. Branco	R. Solimões	AMAZÔNIA	V. Ribeira	TOTAL	De mesa	Bravas
GA136	0,87	0,83	0,88	0,87	0,89	0,87	0,94	0,84
GA126	0,61	0,50	0,81	0,67	0,89	0,71	0,94	0,61
GA012	0,61	0,50	0,50	0,56	0,78	0,60	0,82	0,50
GA131	0,91	0,83	0,88	0,89	1,00	0,91	0,88	0,92
GA134	0,52	0,50	0,06	0,36	0,56	0,38	0,59	0,29
GA013	0,04	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03
GA140	0,83	0,50	0,88	0,80	1,00	0,84	0,88	0,82
GA021	0,43	0,67	0,19	0,38	1,00	0,49	0,88	0,32
GAGG5	0,48	0,50	0,31	0,42	0,78	0,47	0,71	0,37
GA057	0,43	0,67	0,56	0,51	0,67	0,55	0,76	0,45
GA016	0,26	0,33	0,38	0,31	0,67	0,36	0,65	0,24
MÉDIA	0,55	0,53	0,49	0,53	0,75	0,56	0,73	0,49

Comparando os índices encontrados para cada região observam-se valores médios semelhantes, com o grupo do Solimões mostrando uma diversidade um pouco menor que os demais grupos. No entanto, tomando os locos separadamente, há uma considerável variação de índices de diversidade entre as regiões. Um exemplo é o loco GA126, com os índices de diversidade  $DI = 0,65$ ,  $DI = 0,42$ ,  $DI = 0,59$ ,  $DI = 0,56$  e  $DI = 0,77$  para as diferentes regiões.

Quanto aos índices de diversidade para as mandiocas de mesa, em média foram um pouco maiores que das mandiocas bravas:  $DI = 0,51$  e  $DI = 0,55$  respectivamente. Mas em três locos a situação foi inversa (GA131, GA136 e GA140).

Foram feitas estimativas da distribuição da diversidade entre e dentro dos grupos, através dos coeficientes de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ). Os resultados destes cálculos estão na TABELA 7. Os valores de  $H_T$  são os mesmos apresentados com a denominação de índices de diversidade (DI), na TABELA 6.

No agrupamento por região de origem o valor médio de  $G_{ST}$  é 0,07 enquanto que no agrupamento por tipo de uso o  $G_{ST}$  é 0,04.

### Índices de similaridade

A TABELA 8 apresenta de forma resumida os valores médios, mínimos e máximos de similaridade, por tipo de marcador, para as variedades de mandioca avaliadas. Em função do maior polimorfismo encontrado para os microssatélites, tanto o índice médio de similaridade como a amplitude de variação entre mínimo e máximo, refletem uma variabilidade genética maior que a encontrada por meio de RAPD e AFLP.

Para os marcadores de RAPD e AFLP os índices de similaridade são altos, com média de  $S = 0,85$

para AFLP e  $S = 0,89$  para RAPD. A amplitude de variação dos índices de similaridade para RAPD e AFLP não foi muito grande, ou seja, 0,81 a 0,99 para RAPD e 0,75 a 1,00 para AFLP. Para microssatélites, a amplitude foi maior: o valor mínimo de similaridade entre duas variedades foi  $S = 0,24$ , o máximo foi  $S = 1,00$  e a média foi de  $S = 0,59$ .

TABELA 7 - Valores de  $G_{ST}$ ,  $H_T$ , e  $H_S$  para 11 locos de microssatélite. Variedades de mandioca agrupada das por região de origem e por tipo de uso.

	Região de origem			Tipo de uso		
	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$
GA012	0,59	0,55	0,06	0,59	0,59	0,00
GA013	0,02	0,02	0,00	0,02	0,02	-0,01
GA016	0,34	0,32	0,07	0,34	0,32	0,05
GA021	0,60	0,54	0,09	0,60	0,53	0,11
GA057	0,58	0,53	0,08	0,58	0,55	0,04
GA126	0,68	0,63	0,07	0,68	0,66	0,03
GA131	0,79	0,74	0,06	0,79	0,75	0,04
GA134	0,38	0,35	0,09	0,38	0,40	-0,04
GA136	0,72	0,68	0,06	0,72	0,71	0,01
GA140	0,79	0,73	0,08	0,79	0,76	0,04
GAGG5	0,57	0,53	0,07	0,57	0,51	0,11
Média	0,55	0,51	0,07	0,55	0,53	0,04

TABELA 8 - Índices de similaridade de Nei & Li, entre 55 variedades de mandioca (Média, mínimo e máximo, por tipo de marcador: RAPD, AFLP e microssatélites).

	RAPD	AFLP	Microssatélites	TODOS
Média	0,89	0,85	0,59	0,85
Mínimo	0,81	0,75	0,24	0,78
Máximo	0,99	1,00	1,00	0,99

TABELA 6 - Índices de diversidade (ID), para 11 locos de microssatélite, por grupo de variedades de mandioca.

	R. Negro	R. Branco	R. Solimões	Amazônia	V. Ribeira	TOTAL	De mesa	Bravas
GA012	0,51	0,67	0,58	0,59	0,54	0,59	0,62	0,56
GA013	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,03
GA016	0,23	0,44	0,30	0,33	0,49	0,34	0,47	0,25
GA021	0,52	0,65	0,50	0,56	0,62	0,60	0,62	0,48
GA057	0,43	0,65	0,57	0,55	0,62	0,58	0,64	0,50
GA126	0,65	0,42	0,59	0,56	0,77	0,68	0,76	0,59
GA131	0,74	0,76	0,77	0,76	0,66	0,79	0,67	0,77
GA134	0,52	0,38	0,06	0,32	0,40	0,38	0,42	0,38
GA136	0,74	0,63	0,69	0,69	0,54	0,72	0,61	0,74
GA140	0,74	0,78	0,72	0,75	0,66	0,79	0,66	0,78
GAGG5	0,57	0,50	0,52	0,53	0,48	0,57	0,54	0,48
Média	0,52	0,53	0,48	0,51	0,53	0,55	0,55	0,51

Calculando os índices de similaridade a partir das 339 bandas geradas pelos três tipos de marcador, o valor médio encontrado foi  $S = 0,85$ , com mínimo de  $S = 0,78$  e máximo de  $S = 0,99$ .

### Similaridade dentro e entre grupos de variedades de mandioca

Nas TABELAS 9 a 11 estão os índices médios de similaridade entre genótipos dentro (na diagonal) e entre regiões, para cada tipo de marcador. Observa-se que há uma tendência, ainda que pequena, da similaridade ser maior entre as variedades de uma mesma região que entre variedades de regiões diferentes.

Essa tendência é mais clara na matriz baseada em dados de microssatélites, por isso a TABELA 11 será analisada com mais detalhe. A situação mais contrastante é das variedades provenientes do litoral de São Paulo: o índice médio de similaridade dentro do grupo é  $S = 0,71$ , enquanto que entre estas 9 variedades e as variedades do Solimões e do Rio Branco o índice médio é  $S = 0,57$  e em relação às variedades do Rio Negro este índice é de apenas  $S = 0,51$ .

TABELA 9 - Índices médios de similaridade entre e dentro de regiões. Índice de Nei & Li, a partir de 156 bandas de RAPD.

	Rio Negro	Rio Branco	Rio Solimões	Vale do Ribeira
Rio Negro	0,89			
Rio Branco	0,88	0,88		
Rio Solimões	0,88	0,88	0,88	
Vale do Ribeira	0,88	0,88	0,88	0,92

TABELA 10 - Índices médios de similaridade entre e dentro de regiões. Índice de Nei e Li, a partir de 134 bandas de AFLP.

	Rio Negro	Rio Branco	Rio Solimões	Vale do Ribeira
Rio Negro	0,85			
Rio Branco	0,84	0,86		
Rio Solimões	0,84	0,84	0,85	
Vale do Ribeira	0,82	0,86	0,83	0,89

TABELA 11 - Índices médios de similaridade entre e dentro de regiões. Índice de Nei e Li, a partir de 49 bandas de microssatélites.

	Rio Negro	Rio Branco	Rio Solimões	Vale do Ribeira
Rio Negro	0,62			
Rio Branco	0,52	0,58		
Rio Solimões	0,57	0,58	0,61	
Vale do Ribeira	0,51	0,57	0,57	0,71

*Scientia Agricola*, v.57, n.2, p.319-328, abr./jun. 2000

A situação menos contrastante é das variedades provenientes do Rio Branco. O índice de similaridade médio dentro do grupo de 6 variedades é  $S = 0,58$ , igual ao índice médio encontrado na comparação destas variedades com as de Solimões, e muito próximo do encontrado na comparação com as variedades do litoral de São Paulo com  $S = 0,57$ . O índice é um pouco menor na comparação com as variedades do Rio Negro  $S = 0,52$ .

Para as variedades do Solimões, o índice médio de similaridade dentro do grupo é  $S = 0,61$ . Nas comparações com os outros grupos, os valores encontrados são  $S = 0,58$  em relação às variedades do Rio Branco e  $S = 0,57$  em relação às variedades do Rio Negro e do litoral de São Paulo.

O grupo do Rio Negro, assim como os outros dois grupos de variedades da Amazônia, também apresenta uma média de similaridade dentro do grupo ( $S = 0,62$ ) menor que a encontrada no grupo do litoral de São Paulo. Na comparação entre grupos, os índices médios de similaridade são  $S = 0,57$ ,  $S = 0,52$  e  $S = 0,51$ , em relação às variedades do Solimões, Rio Branco e litoral de São Paulo, respectivamente.

Quanto aos dois tipos de uso, a similaridade também foi maior dentro de grupos do que entre grupos, para os três marcadores (TABELA 12). Assim como no agrupamento por regiões, os índices de similaridade baseados em bandas de microssatélites mostram melhor essa tendência do que os outros marcadores: o valor médio de similaridade dentro do grupo de variedades de mesa foi  $S = 0,68$ , e do grupo de mandiocas bravas foi  $S = 0,59$  enquanto que entre os dois grupos o valor médio de similaridade, baseado em microssatélites, foi  $S = 0,53$ .

TABELA 12 - Índices médios de similaridade de Nei & Li, entre e dentro de grupos, por tipo de uso, para três tipos de marcadores de DNA.

	RAPD	AFLP	Microssatélites
Entre grupos	0,87	0,83	0,53
De mesa	0,91	0,88	0,68
Bravas	0,89	0,85	0,59

### Análise de coordenadas principais (PCoA)

Análises de coordenadas principais mostraram que a porção de variabilidade acumulada nos novos eixos, gerados pelas análises, não é grande. Mesmo com esta limitação, foram produzidos gráficos bidimensionais, plotando os novos "escores" para as variedades de mandioca em função dos dois primeiros eixos definidos nas análises.

Na Figura 1 vê-se a dispersão das 55 variedades de mandioca em função de 156 bandas de RAPD. Estão destacados os tipos de uso. Na Figura 2 vê-se a

dispersão das variedades em função de 134 bandas de AFLP. Aqui também a divisão entre mandiocas bravas e de mesa é visível mas não tão definida como nos gráficos anteriores. As mandiocas bravas formam um único grupo mas bastante disperso. As mandiocas de mesa formam dois grupos, um deles com apenas três variedades: DG045, DG061 e DG068. Estas variedades, em relação à coordenada principal 1, estão em posição intermediária entre o grupo de mandiocas bravas e de mesa.

Na Figura 3, com a dispersão baseada nas 49 bandas de microssatélites, apesar das mandiocas de mesa se manterem separadas das bravas, em função da coordenada principal 1, os dois grupos estão bastante dispersos.

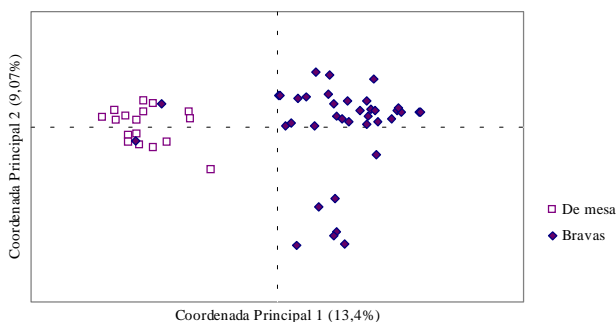


Figura 1 - Dispersão de 55 variedades de mandioca por similaridade de PCoA - A partir de 156 bandas de RAPD.

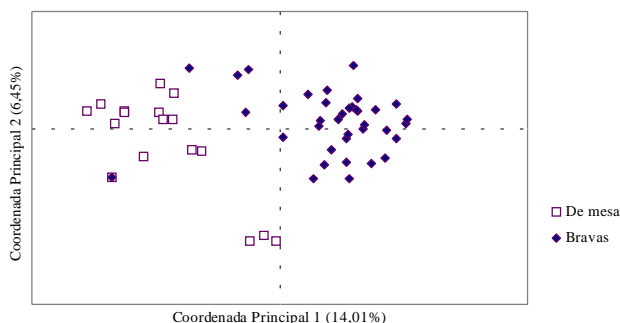


Figura 2 - Dispersão de 55 variedades de mandioca por similaridade de PCoA - A partir de 134 bandas de AFLP.

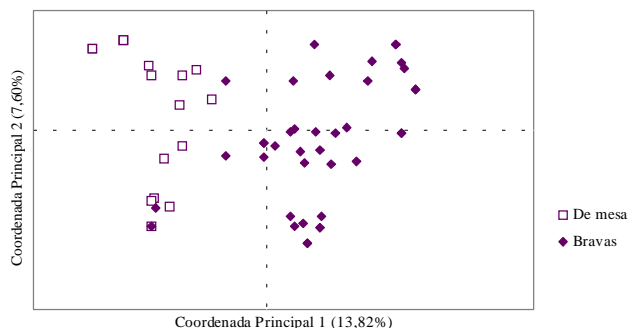


Figura 3 - Dispersão de variedades de mandioca por similaridade de PCoA - A partir de 49 bandas de microssatélites.

## Considerações finais

Os resultados obtidos com os três marcadores, quanto à distribuição da diversidade genética entre as etnovarieties de mandioca foi similar, no plano geral, mas com variações.

A distinção, por meio dos marcadores de DNA, entre variedades de mesa e bravas, se comprovada, pode ter implicações no entendimento da origem e domesticação destes dois tipos de mandioca. Pode ser uma indicação de vias distintas de domesticação.

A existência de níveis de heterozigidade significativamente diferentes, para os locos de microssatélites, entre variedades de mesa e bravas, ou entre variedades da Amazônia e do litoral de São Paulo, também é um aspecto a ser explorado.

Como todas as variedades oriundas do litoral de São Paulo eram de mesa, não foi possível distinguir perfeitamente o efeito região do efeito tipo, nos agrupamentos por similaridade. Seria necessário incluir variedades bravas entre as variedades do litoral de São Paulo para uma comprovação dos resultados encontrados.

Os resultados obtidos por Cury (1998), avaliando o mesmo conjunto de variedades de mandioca, com descritores morfológicos, caracteres agrônômicos e bioquímicos, não indicaram uma distinção genética entre variedades bravas e de mesa ou entre grupos de variedades de diferentes regiões de origem.

A possível existência de uma compartimentalização do germoplasma de mandioca entre variedades bravas e de mesa deve ser levada em consideração no planejamento e interpretação de estudos de diversidade genética da mandioca.

Em vista da similaridade dos resultados obtidos com os três tipos de marcador de DNA, decorre que o uso de apenas um tipo de marcador é suficiente para avaliar a diversidade genética de variedades de mandioca, desde que o número de marcas seja adequado.

## CONCLUSÕES

- Marcadores de DNA do tipo RAPD, AFLP e microssatélites, são ferramentas úteis na avaliação de diversidade genética de etnovarieties de mandioca.
- A variabilidade dos locos de microssatélites é bastante superior à detectada por RAPD ou AFLP.
- Os três tipos de marcador de DNA detectaram uma possível compartimentalização do germoplasma de mandioca em dois grupos: variedades bravas e variedades de mesa (aipins e macaxeiras).

## AGRADECIMENTOS

Este artigo é uma homenagem à memória de Paulo Sodero Martins.

Agradecemos ao Dr. William Roca e ao Dr. Joseph Tohme as facilidades no Centro Internacional de Agricultura



Tropical (CIAT) onde parte dos ensaios de laboratório foram feitos. Agradecemos também o apoio financeiro da FAPESP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEM, A.C. *Manihot esculenta* is native of the neotropics. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.71, p.22-24, 1987.
- BOSTER, J.S. Selection for perceptual distinctiveness: Evidence from Aguaruna cultivars of *Manihot esculenta*. **Economic Botany**, v.49, p.310-325, 1985.
- BRUSH, S.B.; CARNEY, H.J.; HUÁMAN, Z. Dynamics of Andean potato agriculture. **Economic Botany**, v.35, p.70-78, 1981.
- CARVALHO, L.J.C.B.; SCHAAL, B.A.; FUKUDA, W.M.G. Phenetic relationships and genetic diversity among cassava (*Manihot esculenta* Crantz) land races revealed by PCR-based markers. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p.14, 1998. Suplemento.
- CATTAN-TOUPANCE, L.; MICHALAKIS, Y.; NEEMA, C. Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean centre of origin. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.844-851, 1998.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; MAYA, M.M.; BONIERBALE, M.V.; KRESOVICH, S.; FREGENE, M.A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.493-501, 1998.
- CLEVELAND, D.A.; SOLERI, D.; SMITH, S.E. Do folk crop varieties have a role in sustainable agriculture? **BioScience**, v.44, p.740-751, 1994.
- COLOMBO, C. Etude de la diversité génétique de maniocs américains (*Manihot esculenta* Crantz) par les marqueurs moléculaires (RAPD et AFLP). Montpellier, 1997. 161p. Thèse (Doctorat) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- COLOMBO, C.; VALLE, T.L. AFLP and RAPD markers for study the genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p.14, 1998. Suplemento.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T.L.; CHARRIER, A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.105-113, 1998.
- CURY, R. Dinâmica evolutiva e caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) na agricultura autóctone. Piracicaba, 1993. 103p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CURY, R. Distribuição da diversidade genética e associação de caracteres em etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). Piracicaba, 1998. 103p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.R. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology and Reproduction**, v.1, p.19, 1983.
- DUFOUR, D.L. Cyanide content of cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) cultivars used by Tukanoan indians in northwest Amazonia. **Economic Botany**, v.42, p.255-266, 1988.
- DUFOUR, D.L.; WILSON, W.M. La douceur de l'amertume: une ré-évaluation des choix du manioc amer par les indiens Tukano d'Amazonie. In: HLADIK, C.M.; HLADIK, A.; PAGEZY, H.; LINARES, O.F.; KOPPERT, G.J.A.; FROMENT, A. (Ed.) **L'alimentation en forêt tropicale**. Interactions bioculturelles et perspectives de développement. Paris: UNESCO, 1996. v.11, cap.55, p.875-896.
- EMPERAIRE, L.; PINTON, F.; SECOND, G. Gestion dynamique de la diversité variétale du manioc en Amazonie du Nord-Ouest. **Natures Sciences Sociétés**, v.6, p.27-42, 1998.
- HAMON, P.; TOURE, B. Characterization of traditional yam varieties belonging to the *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex by their isozymic patterns. **Euphytica**, v.46, p.101-107, 1990.
- HERSHEY, C.H. *Manihot* genetic diversity. In: International network for cassava genetic resources. **International Crop Network Series** (IPGRI), v.10, p.111-134, 1994.
- KERR, W.E.; CLEMENT, C.R. Práticas agrícolas de conseqüências genéticas que possibilitaram aos índios da Amazônia uma melhor adaptação às condições ecológicas da região. **Acta Amazônica**, v.10, p.251-261, 1980.
- MARTINS, P.S. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.66, p.219-223, 1994. Suplemento, 1.
- McKEY, D.; BECKERMAN, S. Chemical ecology, plant evolution and traditional manioc cultivation systems. In: HLADIK, C.M.; HLADIK, A.; LINARES, O.F.; PAGEZY, H.; SEMPLE, A.; HADLEY, M. (Ed.) **Tropical forests, people and food**. Biocultural interactions and applications to development. Paris: UNESCO, 1993. v.13, cap.8, p.85-112.
- MKUMBIRA, J.; LAGERCRANTZ, U.; CHIWONA-KARITUN, L.; ROSLING, H.; GULLBERG, U. Genotyping of cassava cultivars in farmers fields in Northern Malawi. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 4., Salvador, 1998a. **Poster**.
- MKUMBIRA, J.; MAHUNGU, N.M.; SALIPIRA, K.L. Distribution of hydrogen cyanide in cassava germplasm in Malawi. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.17, p.75, 1998b. Suplemento.
- MÜHLEN, G.S. Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e microssatélites. Piracicaba, 1999. 176p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences from the USA**, v.70, p.3321-3323, 1973.
- NEI, M.; LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences from the USA**, v.76, p.5269-5273, 1979.
- NORMANHA, E.S. Diferenças entre mandioca mansa e brava. **O Agrônomo**, v.8, p.14, 1956.
- NYE, M.M. Mis-measure of manioc (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae). **Economic Botany**, v.45, p.47-57, 1991.
- OLSEN, K.M.; SCHAAL, B.A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v.96, p.5586-5591, 1999.
- PEREIRA, A.S.; NERY, J.P.; IGUE, T. Seleção de novos clones de mandioca para mesa, pela toxicidade e paladar de suas raízes "in natura". **Bragantia**, v.24, p.55-58, 1965.
- PEREIRA, A.S.; PINTO, M.G. Determinação da toxicidade da mandioca pelo paladar das raízes "in natura". **Bragantia**, v.21, pt.2, p.145-150, 1962.
- PERONI, N. Taxonomia folk e diversidade intraespecífica de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em roças de agricultura tradicional em áreas de Mata Atlântica do sul do Estado de São Paulo. Piracicaba, 1998. 191p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- RENVOIZE, B.S. The area of origin of *Manihot esculenta* as a crop plant - a review of the evidence. **Economic Botany**, v.26, p.352-360, 1972.
- ROA, A.C. Estimación de la diversidad genética en *Manihot* spp. mediante morfología y marcadores moleculares. Cali, 1996. 222p. Tesis (Grado) - Facultad de Ciencias, Universidad del Valle.
- ROGERS, D.J.; FLEMING, H.S. A monograph of *Manihot esculenta* Crantz. **Economic Botany**, v.27, p.1-114, 1973.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Applied Biostatistics, 1992. 237p.
- ROSLING, H. Molecular anthropology of cassava cyanogenesis. In: BWS Sobral (Ed.) **The impact of plant molecular genetics**. Boston: Birkhauser, 1996. cap.18, p.315-327.
- SALICK, J.; CELLINESE, N.; KNAPP, S. Indigenous diversity of cassava: generation, maintenance, use and loss among the Amuesha, Peruvian upper Amazon. **Economic Botany**, v.51, p.6-19, 1997.
- SAMBATTI, J.B.M. Erosão genética e conservação de germoplasma de mandioca na agricultura autóctone em Ubatuba-SP. Piracicaba, 1998. 165p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SINHA, S.K.; NAIR, T.V.R. Studies on the variability of cyanogenic glucoside content in cassava tubers. **Indian Journal of Agricultural Science**, v.38, p.958-963.
- STRUSS, D.; PLIESKE, J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.308-315, 1998.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; Van De LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods in Enzymology**, v.218, p.706-740, 1993.

---

Recebido em 19.07.99