

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE  
GERMOPLASMA DE INHAME**

**JANÁIRA LOPES DOS SANTOS CARNEIRO**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
MARÇO - 2013**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE  
GERMOPLASMA DE INHAME**

**JANÁIRA LOPES DOS SANTOS CARNEIRO**

Bióloga  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

Dissertação submetida ao Colegiado do  
Curso do Programa de Pós-Graduação em  
Recursos Genéticos Vegetais da  
Universidade Federal do Recôncavo da  
Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura,  
como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Mestre em Recursos Genéticos

**Orientador: Profº. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva**

**Co-orientador: Drª. Cláudia Fortes Ferreira**

**Co-orientador: Profº. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

C289

Carneiro, Janáira Lopes dos Santos.

Caracterização morfológica e molecular de germoplasma de inhame / Janáira Lopes dos Santos Carneiro. \_ Cruz das Almas, BA, 2013.

117f.; il.

Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva.

Coorientadora: Cláudia Fortes Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

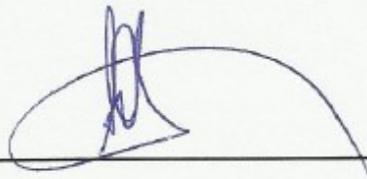
1.Inhame - Germoplasma. 2.Melhoramento genético - Marcadores moleculares. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Moreira, Ricardo Franco Cunha. III.Título.

CDD: 635.23

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

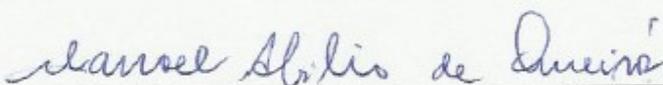
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
JANÁIRA LOPES DOS SANTOS CARNEIRO



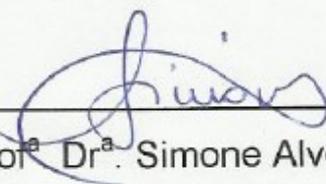
---

Prof. Dr. Sebastião de Oliveira e Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Manoel Abílio de Queiróz  
Universidade do Estado da Bahia - UNEB



---

Prof. Dr. Simone Alves Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Dissertação (ou tese) homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em  
Recursos Genéticos Vegetais em.....

Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em

.....

## DEDICATÓRIA

**A Deus;**

À minha família;

Em especial, a minha inspiração para todos os dias da minha vida, minha estrela maior, minha eterna amiga, companheira e **mãe Jaciara** (*in memoriam*).

Dedico

Ao meu amado pai Edson Oliveira Carneiro

Aos meus avós Everilda, João, Edvaldo e Renalice

Ao companheiro, amigo e namorado Roger Ramos

A minha irmã Ellen Josina Lopes dos Santos Carneiro

Ofereço

*“A fé desempenha em nossa vida um papel mais importante do que supomos, e é o que nos permite fazer mais do que pretendemos. Creio que aí está o elemento precursor de nossas ideias. Sem a fé não se teriam elaborado jamais hipóteses e teorias, nem se teriam inventado as ciências ou as matemáticas. Estou convencido de que a fé é um prolongamento do espírito: negar a fé é condenar-se e condenar o espírito que engendra todas as forças criadoras de que dispomos.”*

*(Charlie Chaplin)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dá forças para vencer todos os obstáculos e permitir concluir mais essa etapa tão importante da minha vida;

A meus pais, especialmente a minha mãe (*in memoriam*) que me incentivou através das minhas orações nos momentos mais difíceis nessa etapa;

A meu namorado, companheiro e amigo por demonstrar imenso afeto e carinho por mim, e principalmente esteve comigo em momentos delicados da minha vida;

A minha família, especialmente aos meus avós pela experiência de vida que me passaram ao longo dessa trajetória;

Ao orientador Sebastião de Oliveira e Silva pela doutrina, atenção e convívio amigável prestado durante a orientação;

Aos co-orientadores Ricardo Franco da Cunha Moreira por sempre me acolher quando precisei e em especial a Cláudia Fortes Ferreira por seu empenho e dedicação, para o desenvolvimento desse trabalho;

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Embrapa-CNPMPF Raimundo Pereira, Vanderson Rodrigues, Fernanda Azevedo pelo auxílio, ajuda e aprendizado em especial a Epaminondas do Patrocínio pela amizade e pela capacidade de não medirem esforços para estarem sempre prontos a colaborar;

As minhas colegas do LBM, Gilmara Fachardo, Cátia Dias, Dalma Brito, todos os demais;

As minhas amigas Maiany Oliveira e Rafaella Roque por todos os momentos vividos e compartilhados neste mestrado;

A equipe de trabalho do inhamé Bizunga, Lucymeire Moraes, mais em especial a Daniela Silveira e Alda Reis, peças chave para o desenvolvimento dessa pesquisa;

A todos os professores do RGV pelo aprendizado e em especial ao professor Loyola pela amizade, e atenção para comigo ao longo desses dois anos de luta;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

A UFRB pela oportunidade de ter realizado o Curso de Mestrado;

A Embrapa-CNPMPF pela estrutura disponibilizada para a execução desse trabalho;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta dissertação.

## SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....1

### Capítulo 1

CARACTERIZAÇÃO DO GERMOPLAMA DE INHAME POR MEIO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS.....32

### Capítulo 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DE INHAME COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES.....56

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....93

ANEXOS.....95

# CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE INHAME

Autora: Janáira Lopes dos Santos Carneiro  
Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-orientador: Cláudia Fortes Ferreira  
Co-orientador: Ricardo Franco Cunha Moreira

**RESUMO:** O objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade genética de inhame proveniente de diversas regiões do Nordeste brasileiro, utilizando marcadores morfológicos e moleculares. Desta forma, foram avaliados 38 acessos via 25 descritores morfológicos, e 32 acessos avaliados com 28 marcadores moleculares, sendo 21 ISSR e sete microssatélites. A identificação da espécie para cada acesso foi feita de acordo com a análise morfológica realizada em campo. Foi calculado o nível de entropia em que dentre as 25 características avaliadas, três foram consideradas de alta entropia, seis média e 16 com baixa entropia demonstrando reduzida variabilidade genética. As distâncias genéticas foram obtidas pelo coeficiente de similaridade de Cole-Rodgers, em que a média da matriz possibilitou a formação dos grupos a partir do método de agrupamento UPGMA. As análises moleculares foram realizadas com diferentes índices de dissimilaridade. O agrupamento foi calculado pelo método hierárquico UPGMA, sendo que os estudos revelaram que tanto os marcadores codominantes quanto os dominantes, foram capazes de diferenciar os acessos e possibilitaram a identificação dos mais contrastantes para uso no programa de melhoramento genético da espécie. Os índices de Jaccard, Ochia e Nei e Li, apresentaram resultados mais consistentes do que os coeficientes de coincidência simples e Sokal e Sneath, por não considerarem a ausência conjunta de bandas. Portanto, foi observada variabilidade genética para ambos os marcadores, morfológicos e moleculares. Pode-se inferir que a maior parte da variabilidade se encontra entre espécies, desconsiderando, portanto, a origem dos acessos.

**Palavras-chave:** *Dioscorea spp*; descritores morfológicos; marcadores moleculares

# MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF YAM GERMPLASM

Author: Janáira Lopes dos Santos Carneiro  
Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-advisor: Cláudia Fortes Ferreira  
Co-advisor: Ricardo Franco Cunha Moreira

**ABSTRACT:** The objective of the present work was to characterize the genetic diversity in yams from various regions of the Northeast of Brazil using morphological and molecular markers. Thirty-eight accessions were evaluated with 25 morphological descriptors and 32 with 28 molecular markers (21 ISSR and 7 microsatellites). The identification of the species for each accession was carried out according to the morphological analysis in the field. The level of entropy was calculated for the 25 characteristics evaluated with three considered with high entropy, six average and 16 with low entropy levels. The genetic distances were obtained by the Cole-Rogers similarity coefficient where clusters were formed by the UPGMA method. The molecular analysis was carried out with different dissimilarity indices. Clusters were formed by the UPGMA hierarchical method and studies showed that the codominant as well as the dominant markers differentiated the accessions and enabled the identification of the most contrasting for use in the genetic breeding of the species. The Jaccard, Ochia and Nei e Li indices presented more consistent results in comparison to the simple coincidence, Sokal and Sneath indices for not simultaneously considering the absence of bands. Therefore, both morphological and molecular markers showed that there is genetic variability. Most of the variability was found between species considering the origin of the accessions.

**Key-words:** *Dioscorea spp*; morphological descriptors; molecular markers

## INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea* spp.) que pertence à família *Dioscoreaceae*, atualmente representa a quarta cultura de raízes e tubérculos mais importante do mundo. As dioscoreáceas estão distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas de todo o mundo (PEDRALLI, 1988).

O gênero *Dioscorea*, ao qual pertence a maioria das espécies cultivadas e silvestres da família, engloba espécies tropicais originárias da África, Ásia e Américas, Central e Sul (PEDRALLI, 1990). O inhame atualmente é cultivado nas regiões tropicais e constitui-se um alimento básico nas Américas Central e Sul, na Ásia e nas ilhas do Pacífico (ABRAMO, 1990). Seus tubérculos são usados na alimentação de mais de 100 milhões de pessoas em todo o mundo; sobretudo nos trópicos úmidos e sub-úmidos (FAO, 2013).

Estimativas da FAO (2013) mostram que em 2009 foram colhidos cerca de 4,7 milhões de hectares de inhame, que geraram 49,2 milhões de toneladas de tubérculos. A África, no entanto, detém a preeminência, ao responder por cerca de 96% da produção total de inhame, destacando-se os países: Gana, Costa do Marfim e Nigéria, os quais são responsáveis por 85% da produção mundial de inhame. No cenário mundial, a Nigéria está em primeiro lugar, com a produção em 2010, de 29 milhões de toneladas (FAO, 2013). As espécies de inhame que mais se destacam no continente Africano são a *Dioscorea cayennensis* e a *D. rotundata*, sendo estas as espécies mais cultivadas no mundo e que representam cerca de 90% da produção mundial.

A respeito dos aspectos nutricionais para a alimentação humana, os tubérculos de inhame são ricos em vitaminas, principalmente as do complexo B e de carboidratos, em especial o amido. Possuem apreciáveis teores de vitaminas A, D e vitamina C, sendo também ricas em minerais como: fósforo, sódio, potássio, cálcio, magnésio e ferro. Outro aspecto relevante referido a esses tubérculos são suas propriedades medicinais, já que são fontes de sapogeninas

esteroidais, utilizadas na produção de cortisona e hormônios esteroides sintéticos (CEREDA, 2002).

Os cultivos de inhame são de suma importância tanto para a agricultura tradicional como também para a agricultura familiar. A maioria das variedades cultivadas são acessos selecionados pelos agricultores entre as variedades locais antigas. Entretanto, há um grande risco de perda da diversidade genética principalmente devido às pressões socioeconômicas sofridas por esses agricultores. Esta realidade reforça a necessidade de se realizar expedições de coleta a fim de preservar esses recursos genéticos por meio de práticas de conservações *ex situ*, e que permitam também a sua utilização em programas de melhoramento.

Na década de 1960 foram iniciados os primeiros trabalhos de melhoramento genético de inhame comestível, com a espécie *D. trifida* no Caribe (DEGRAS, 1969), seguido pelo *D. rotundata* nos anos 1970 na Nigéria (SADIK e OKEREKE, 1975), e só recentemente nos anos 1980 com *D. alata* na Índia (ABRAHAM et al. 1986). A falta de conhecimento sobre a origem genética e diversidade dessas espécies têm limitado a eficiência dos programas de melhoramento genético. Por ser considerada uma cultura órfã, a exploração do inhame não é contemplada nas políticas agrícolas importantes, apresentando carência de apoio técnico e de crédito, normalmente destinados às monoculturas de produtos exportáveis (PEIXOTO NETO et al. 2000; RITZINGER et al. 2003). Segundo Scarcelli et al. (2005), somente atualmente foram obtidos progressos genéticos no melhoramento dessa cultura, graças ao uso de diferentes ferramentas biotecnológicas e, em particular, dos marcadores moleculares, técnicas citogenéticas e do cultivo *in vitro*.

Distintos métodos estão disponíveis para avaliar a variabilidade genética tanto em nível de marcadores morfológicos quanto moleculares. Os descritores morfológicos ainda hoje exercem papel essencial na divulgação das características agronômicas de novos genótipos e podem influenciar categoricamente na seleção de variedades por parte de agricultores. Quando se trata da distinguibilidade exigida pela Lei de Proteção de Cultivares, contudo, os descritores morfológicos exibem restrições, especialmente quanto a distinção de genótipos elites, aparentados. Em culturas de base genética estreita, esses

descritores podem muitas vezes não distinguir adequadamente os cultivares comerciais (SMITH e SMITH, 1992; PECCHIONI et al. 1996). Ainda que a caracterização feita com descritores morfológicos continue sendo predominantemente importante, as limitações do seu uso tem gerado a necessidade de buscar alternativas. Uma delas, que tem sido promissora é o emprego dos descritores de DNA, baseada no genótipo do indivíduo. Essa técnica é especialmente aplicada na distinção de genótipos morfológicamente análogos e geneticamente aparentados.

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados nas mais variadas espécies para o processo de descrição do material vegetal e como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento genético para acessar a variabilidade genética entre genótipos. Dentre os marcadores moleculares, os microsatélites, também conhecidos como SSR – (*Simple Sequence Repeats* - Repetições curtas em *tandem*), vêm se destacando pela sua robustez e eficiência. Os SSRs são elementos repetitivos de dois a seis nucleotídeos, encontrados em eucariotos e procariotos, obtidos geralmente por meio do sequenciamento da espécie e, portanto, espécie-específicos (FERGUSON et al. 1995; MILACH, 1998; MATIOLI, 2001). O polimorfismo desses marcadores se baseia na variação do número dos elementos repetitivos, provavelmente devido ao erro da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (STUDART, 2001). Esses marcadores são codominantes, altamente multialélicos e amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com pouca quantidade de DNA e podem ser facilmente usados desde que sejam desenvolvidos os *primers* que amplificam as regiões específicas do genoma (AGARWAL et al. 2008). Embora sejam marcadores espécie-específicos, existe a possibilidade de estudos de transferabilidade desses marcadores em espécies próximas (LISHAN et al. 2007; WANG et al. 2009).

Os marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) (ZIETKIEWICZ et al. 1994; REDDY et al. 2002) se baseiam nas informações dos microsatélites, porém não necessitam do conhecimento prévio do genoma. São marcadores arbitrários, amplificados por PCR em presença de um oligonucleotídeo complementar para um determinado microsatélite e vem sendo empregados em programas de melhoramento para a diferenciação rápida entre indivíduos

próximos, devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo. Também podem contribuir com informações para a seleção e identificação de genótipos que poderão ser usados como futuros genitores na obtenção de novas variedades. Nos casos de espécies perenes, de ciclo longo, a vantagem de usar esses marcadores de DNA é a não necessidade de se ter que esperar alguns anos até que a característica fenotípica se expresse para se fazer a seleção.

O sucesso de um programa de melhoramento reside na existência de variabilidade, em que essa pode ser avaliada a partir de características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras. As informações múltiplas de cada cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade que há no conjunto de genótipos estudados. Para Dias et al. (1997), a divergência entre acessos, avaliada por estatística multivariada, pode proporcionar uma descrição sintética da afinidade genética entre acessos e populações. Assim, a quantificação da dissimilaridade genética é um dos mais importantes parâmetros estimados pelos melhoristas de plantas, principalmente quando o objetivo é a obtenção de populações com ampla variabilidade genética (BENIN et al. 2003).

Para decidir até que ponto dois elementos de um mesmo conjunto podem ser considerados como semelhantes ou não, é necessário considerar as medidas que descrevem a similaridade entre os elementos amostrais de acordo com as características que neles foram avaliadas. Essas medidas podem ser estimadas com base na avaliação morfológica do fenótipo da planta (CRUZ e REGAZZI, 1997) por meio de dados moleculares através do polimorfismo de DNA (OLIVEIRA, 1998; DINIZ FILHO, 2000), ou ainda mediante informações disponíveis da genealogia (VAN BEUNINGEN e BUSEH, 1997; KIM e WARD, 1997). Cruz (2008) apresenta os procedimentos para estimar medidas de dissimilaridade com base em variáveis quantitativas (distâncias Euclidianas ou Mahalanobis), binárias (índice de Jaccard, Nei e Li, etc.) e multicategóricas (Cole-Rodgers).

A variabilidade genética é a base para os programas de melhoramento, por isso, é muito importante a caracterização do germoplasma dessa espécie. Assim, esse trabalho buscou efetuar a caracterização morfológica, através de descritores

qualitativos multicategóricos, quantitativos e molecular utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR) e do tipo ISSR, do Germoplasma de Inhame (GI) estabelecido na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), para estimar a diversidade genética entre os acessos do GI e fornecer informações básicas quanto a diversidade a ser explorada dentro de um programa de melhoramento da espécie.

## REVISÃO DE LITERATURA

### - Origem e Distribuição de *Dioscorea*

O gênero *Dioscorea* teve uma vasta dispersão mundial ao fim do período Cretáceo, com evolução para diferentes direções no Novo e no Velho Mundo, originando assim espécies distintas. As Américas (Central e Sul), África, Sul e Sudeste Asiático, Austrália e Melanésia, ao Norte da Austrália, foram as principais regiões para a dispersão das inúmeras espécies do gênero (LEBOT, 2009). Segundo Coursey (1967), a separação das espécies asiáticas e africanas teria ocorrido mais tarde, durante o Mioceno, há aproximadamente 5 milhões de anos.

As espécies *D. cayennensis* Lam. e *D. rotundata* Poir., internacionalmente conhecidas como inhame amarelo e inhame branco, respectivamente, originaram-se no continente africano (COURSEY, 1976; AMUSA et al. 2003). Para Vavilov (1951) as espécies *Dioscorea alata* e *D. esculenta* originaram-se em Myanmar e Assam, na Índia. Essa cultura é cultivada pelo homem desde a antiguidade e sua importância na alimentação do povo africano em especial, sempre foi grande. A dispersão de todas as espécies para a civilização ocidental se deu com a intensificação do tráfico de escravos (ABRAMO, 1990).

Muitas variedades de inhame foram introduzidas na América do Sul por intermédio dos portugueses e espanhóis no século XVI, durante a colonização. Por outro lado, os portugueses e espanhóis descrevem que depararam com os índios cultivando plantas desse gênero quando chegaram à América; por isso o inhame também é conhecido como cará, que é originário da língua tupi-guarani (ABRAMO, 1990).

O inhame, nos dias atuais, é amplamente cultivado nas regiões tropicais, servindo de alimento nas Américas Central e do Sul, na Ásia e nas Ilhas do Pacífico. Na África, a população denomina as Dioscoreaceas como *yam* (fome)

para denominar as várias espécies de tubérculos comestíveis e que se destacam nos primeiros lugares do consumidor popular (ABRAMO, 1990).

As espécies *D. rotundata* e *D. cayennensis*, embora sejam muito parecidas, são reconhecidas por vários autores como duas espécies distintas, ou seja, *Dioscorea rotundata* e *Dioscorea cayennensis* (BURKILL, 1960; AYENSU, 1972; AKORODA e CHHEDA, 1983; CHAIR et al. 2005; SCARCELLI et al. 2005; TOSTAIN et al. 2007), mas outros estudiosos, as analisam como sendo um complexo de espécies: *D. cayennensis-rotundata* (HAMON e TOURE, 1990; DANSI et al. 1999). O Inhame-da-Costa ou Cará-da-Costa, cultivar mais utilizada no Brasil, apresenta as características do inhame branco e pertence a este complexo, sendo referido como uma cv. de *D. cayennensis* (SILVA, 1971; SANTOS, 1996; MOURA, 2005) ou de *D. rotundata* (PIO RIBEIRO et al. 2005; 2006).

As principais espécies cultivadas pela ordem de área de plantio são: *D. alata*, com os tipos Cará São Tomé, Cará Mandioca, Cará Florida, seguida de *D. cayennensis*, com vários tipos (Cará-da-Costa, Cará Tabica, Cará Negro), *D. bulbifera*, *D. trifida* e *D. esculenta* (CHU e FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1991).

### - Aspectos Botânicos

O inhame (*Dioscorea* spp.), pertence à classe Monocotiledônea, e família Dioscoreaceae. É uma planta herbácea com ramas, trepadeira (em geral) quando encontra apoio, com tubérculos subterrâneos (aéreas em algumas espécies nas axilas das folhas). É uma planta dioica em sua grande maioria embora plantas monoicas tenham sido observadas em algumas espécies em uso (DANSI et al., 1997); cultivada devido às seus tubérculos ricos em amido; apresenta multi-ápices, sistema reprodutivo por alogamia e propagação vegetativa, exclusivamente por meio de tubérculos sementes, que são pequenos tubérculos ou pedaços de tubérculos.

As plantas possuem inflorescência na forma de espigas axilares, geralmente solitárias raramente ocorrendo aos pares, com flores trímeras verdes de 4 mm a 6 mm de diâmetro. As flores masculinas possuem perigônio com seis peças em dois verticilos, apresentando seis estames com anteras férteis,

distribuídas em um só verticilo. O fruto do inhame é uma capsula com três locos, cada loco com duas diminutas sementes aladas (SILVA, 1971).

O número básico de cromossomos das espécies de *Diocorea* é considerado  $x = 10$  e  $x = 9$ , com alta frequência de espécies poliploides (BOUSALEM *et al.*, 2006). Espécies tetraploides são mais frequentes, seguidas de tipo  $2x$ ,  $6x$  e  $8x$  em proporções similares. O número básico de cromossomos,  $x = 10$ , é encontrado em 52% das espécies africanas.

Existem em torno de 10 espécies cultivadas de inhame. As principais são: *D. rotundata*, *D. cayennensis*, *D. alata* e *D. trifida*, enquanto as seis outras são frequentemente referidas como menos importantes. As espécies *D. alata*, *D. rotundata* e *D. cayennensis*, pertencem à secção *Enantiophillium*, que inclui espécies com enrolamento anti-horário, caule alado e folhas inteiras. A espécie *D. trifida* pertence à secção *Macrogynodium*, sendo caracterizada por enrolamento no sentido horário, caule alado e folhas lobadas (ARNAU *et al.*, 2010 *in press*)

Para Montaldo (1999) as principais características de cada espécie podem ser agrupadas da seguinte forma:

- *D. alata*: apresenta tubérculos solitários ou agrupados de 2-4, redondos, cilíndricos, oblongos ou de forma irregular. Alguns tubérculos podem chegar a pesar de 2 a 3 kg. Presença de tubérculos aéreos, com talos fortemente alados, sem espinhos, de cor verde ou púrpura. A torção dos talos é no sentido anti-horário. Folhas encouraçadas, simples e opostas. Na atualidade constitui-se na principal espécie cultivada dos trópicos;
- *D. cayennensis*: tubérculo solitário com peso variando de 1 a 10 kg, geralmente grosso e ramificado com polpa amarela. Caule cilíndrico, espinhoso, que se enrola no sentido horário. Folhas simples, eretas, opostas e alternadas encouraçadas. Espécie muito cultivada na África Ocidental e alguns países na América Tropical. Seguem em importância mundial à *D. alata*.
- *D. bulbifera*: um tubérculo subterrâneo por planta, branco e globoso, comestível e às vezes amargo. Tubérculos aéreos podem chegar de 100 a 200 g e são utilizados como alimento. Caules cilíndricos sem espinhos com torção para a esquerda. Folhas simples, eretas, grandes alternadas e opostas. Cultivado no sudeste da Ásia, África, Ilhas do Pacífico e Américas.

- *D. trifida*: tubérculos pequenos de 15 cm de largura, redondos ou cônicos. Polpa branca, amarela ou púrpura. Excelente qualidade culinária. Caules quadrangulares, alados e sem espinhos. Torção no sentido anti-horário. Folhas palmadas, profundamente lobuladas, alternadas, raramente opostas. Originária da América Tropical onde é muito cultivada.

### - Importância Econômica da Cultura do Inhame no Mundo

A África possui a maior parte da produção mundial de *Dioscorea*, onde são cultivados cerca de 96% do inhame produzido no mundo, sendo a Nigéria responsável por 75% desta produção. Em 1974 foi estimado o cultivo anual de 25 milhões de toneladas, alcançando em 2000 a marca de 37,5 milhões de toneladas. Também durante este período, a quantidade de exportação diminuiu drasticamente.

Durante o período de 1975 - 1990, a área total cultivada por inhame aumentou em cerca de 38,8%, enquanto o aumento da produção foi de 45,8%. No entanto, a importância do inhame na economia das principais áreas produtoras parece estar em declínio, em parte, devido à concorrência com outras culturas como a mandioca na Nigéria, e taro no Pacífico Sul (OPARA, 1999). O taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schot) pertence à família *Araceae*. É uma hortaliça originária da Ásia, de fácil adaptação a diferentes climas tropicais e subtropicais e se caracteriza pela grande capacidade de produção em condições adversas de cultivo devido à sua semelhança com o inhame. No Sul do Brasil, principalmente, a denominação para *Dioscorea* como inhame, era aplicada ao gênero *Colocasia*, gerando confusão entre técnicos, produtores e mesmo em relação aos consumidores (CEREDA, 2002).

A mandioca é a mais importante das culturas tropicais, ficando o inhame como o segundo de maior importância. O inhame é um alimento básico em muitas regiões da África e Sudeste Asiático. No Pacífico Sul, é uma cultura alimentar significativa, respondendo por mais de 20%, 8,1% e 4,6% do consumo total de calorias da dieta no Reino de Tonga, Ilhas Salomão e Papua Nova Guiné, respectivamente. Além de sua importância como fonte de alimento, o inhame também desempenha um papel significativo na vida sociocultural de algumas regiões produtoras como no célebre Festival de Inhame na África Ocidental. Em

algumas partes do sudeste da Nigéria, as refeições oferecidas aos deuses e ancestrais, consistem principalmente de purê de inhame (OPARA, 2001).

O armazenamento do inhame é relativamente longo em comparação com outros produtos tropicais frescos. O inhame, portanto, representa a riqueza armazenada que pode ser vendida pelo agricultor ou comerciante. Em partes da Ibolândia, no sudeste da Nigéria, é habitual para os pais de uma noiva lhe oferecer um plantio de inhame como um recurso para ajudar a criar uma família (OPARA, 2001).

A produção e área plantada, em 2011 no Brasil, foram de aproximadamente 244 mil toneladas e 97 mil hectares, respectivamente (FAO, 2013). A Região Nordeste é a maior produtora, destacando-se os estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Maranhão, onde a cultura do inhame constitui-se em um agronegócio em expansão (SANTOS e MACEDO, 1988; MESQUITA, 2002; SANTOS, 2002).

As espécies *D. rotundata* e *D. cayennensis* (também conhecidas como complexo *D. cayennensis-rotundata*), são as mais cultivadas no mundo e representam 95% da produção mundial de inhame. Estima-se que ocorram no Brasil, entre 150 a 200 espécies de *Dioscorea spp.*, único gênero comestível da família Dioscoreaceae presente em todas as regiões do país. Contudo, a maioria das espécies é ainda pouco estudada (PEDRALLI, 2002).

A Região Nordeste do Brasil detém cerca de 90% da produção nacional de *Dioscorea spp.* Nas regiões produtoras, são mais utilizadas as espécies *D. cayennensis* e *D. rotundata* seguida da espécie *D. alata*. A maior área cultivada de inhame no Estado da Bahia encontra-se no Recôncavo, destacando-se os municípios de Maragogipe, São Felipe, Cruz das Almas e São Félix, com a espécie *D. rotundata* (Cará da Costa, Inhame da Costa, Roxo da Costa e Boca Funda) ocupando mais de 90% da área com inhame (MESQUITA, 2002).

#### **- Recursos Genéticos de Inhame**

Uma das atividades mais importantes dentro dos programas de melhoramento é a conservação ou manutenção de germoplasma. O germoplasma conservado serve como um reservatório de alelos competitivos que podem ser

acessados pelos melhoristas quando buscam desenvolver variedades resistentes/tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos. O local onde os acessos que compõem o germoplasma são conservados é chamado de Banco de Germoplasma (MAXTED et al. 1997).

A conservação é o processo que retêm ativamente a diversidade dos grupos gênicos com a perspectiva de utilização e exploração, presente ou futura, dessa diversidade genética. A base da conservação é a diversidade genética que é constituída da soma das variações alélicas encontradas na natureza. Há uma ligação, íntima, clara e essencial entre conservação e utilização. Assim, os humanos conservam porque desejam utilizar. No entanto, há sempre um custo econômico para se conservar, sendo difícil persuadir a sociedade a “pagar essa conta”, se não houver perspectiva de qualquer retorno econômico. É relativamente fácil atribuir benefícios econômicos à conservação, utilização e exploração de formas varietais regionais ou a progenitores silvestres das culturas associados aos programas de melhoramento, mas é difícil atribuir valor econômico às espécies. Portanto, argumenta-se que todas as plantas possuem algum valor, quer em termos potenciais para o melhoramento da cultura, para utilização imediata, farmacêutica, de recreio, para ecoturismo ou mesmo em nível educacional.

Assim como toda a biodiversidade, a diversidade genética é parte do patrimônio nacional, tal como é a arte e a cultura. Portanto, torna-se importante explicitar a ligação entre manutenção e utilização em qualquer estratégia de conservação (MAXTED et al. 1997).

No melhoramento de plantas, três recursos básicos devem ser explorados para que se consiga maior variabilidade genética. Primeiro, é o conhecimento das diferenças hereditárias entre os acessos da espécie cultivada; o segundo se refere às diferenças que podem ser criadas artificialmente pelo uso de mutagênicos, e o terceiro, são as diferenças que ocorrem entre os parentes silvestres das espécies cultivadas (FARIA, 2009). Segundo Jatasra e Paroda (1983), a informação precisa, sobre a diversidade genética, é decisiva para o sucesso de um programa de melhoramento, uma vez que, plantas geneticamente divergentes, produzem alto efeito heterótico e, conseqüentemente, segregantes desejáveis para os propósitos do programa. Em bancos de germoplasma, este

estudo pode ser realizado por meio da utilização de vários descritores, morfológicos e ou moleculares.

O inhame é uma cultura de multipropagação clonal, com cerca de 10 espécies amplamente cultivadas em todo o mundo. No entanto, as espécies *D. rotundata*, *D. alata* e *D. cayennensis* são as mais utilizadas na África Ocidental, respondendo por 93% da produção de inhame mundial. Desde a criação do IITA (*International Institute of Tropical Agriculture*), na Nigéria, esforços têm focado no desenvolvimento de novas variedades de inhame com características agrônômicas desejáveis e em melhorar qualidade do inhame com base nos sistemas de cultivo (LOPEZ-MONTES, 2012).

O IITA mantém a maior coleção mundial de inhame, respondendo por mais de 3.000 acessos, principalmente de origem da África Ocidental. A coleção é representada por oito espécies: *D. rotundata* (67%), *D. alata* (25%), *D. dumetorum* (1,6%), *D. cayennensis* (2%), *D. bulbifera* (2%), *D. mangelotiana* (0,25%), *D. esculenta* (0,7%), e *D. praehensilis* (0,3%). Os dados de passaporte e informações sobre a caracterização destes acessos são mantidos em bases de dados acessíveis, como no site <<http://genebank.iita.org>>. Para facilitar a utilização do germoplasma de inhame em programas de melhoramento, uma coleção nuclear com 391 acessos foi criada em 2006 e está sendo genotipada a partir de ferramentas como marcadores baseados em DNA. Essa *core collection* foi construída usando descritores morfológicos e representa 75% da diversidade genética da coleção inteira (LOPEZ-MONTES, 2012).

Para reduzir o custo de manutenção de germoplasma de inhame, uma parceria entre IITA e CIRAD foi criada para desenvolver um protocolo de criopreservação. Os esforços para melhorar a conservação de germoplasma de inhame serão utilizados também no Programa de Pesquisa CGIAR (CRP) em raízes, tubérculos e bananeiras (RTB) para melhor garantir a segurança alimentar e renda (LOPEZ-MONTES, 2012).

## - Marcadores Morfológicos

Até meados da década de 60, os estudos genéticos eram desenvolvidos com marcadores morfológicos de fácil identificação da espécie, considerados simples, rápidos e de baixo custo (BRETTEING e WIDRLECHENER, 1995).

A caracterização morfológica constitui a etapa fundamental para o efetivo uso dos recursos genéticos conservados em bancos de germoplasma, uma vez que mais de 200 mil acessos de diversas espécies vegetais encontram-se armazenados em bancos espalhados por todo país, sem as informações mínimas necessárias que facilitam o emprego dos mesmos em programas de melhoramento (VALLS, 1998). O processo de caracterização consiste na anotação de descritores botânicos facilmente visíveis e/ou mensuráveis e que são expressos em todos os ambientes.

A variação fenotípica encontrada em uma determinada espécie pode ser devida ao efeito do ambiente e às diferenças genéticas. Segundo Montalván e Faria (1999) a existência de variação genética é um pré-requisito para o melhoramento de plantas. A caracterização é uma atividade essencial no manejo, melhoramento genético e conservação das espécies, pois consiste em obter dados para descrever, identificar e diferenciar acessos dentro de espécies, classes ou categorias, por meio de descritores adequados (QUEROL, 1993; VICENTE et al. 2005).

O *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, 1997; 1999), atualmente *Bioversity International*, definiu os descritores para as espécies de *Dioscorea* para todo o mundo. O nome padrão adotado para as espécies cultivadas de *Dioscorea* foi *yam* ou inhame, no conceito das regiões Norte e Nordeste do Brasil (PEDRALLI, 2002).

O grande problema enfrentado na caracterização morfológica é a natureza quantitativa dos caracteres, que os tornam fortemente influenciados pelo ambiente. Assim, a identificação e enumeração de características morfológicas visíveis muitas vezes tornam-se subjetivas para o avaliador (BRESSEAN, 2005). Ainda, o número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma linhagem é restrito às poucas espécies de plantas, o que reduz a eficiência em estudos genéticos das mesmas.

Não obstante, as descrições morfológicas são, ainda hoje, o cartão de apresentação de uma nova variedade. Esses descritores exercem 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, esses descritores podem muitas vezes não distinguir adequadamente cultivares comerciais (SMITH; SMITH, 1992; PECCHIONI et al. 1996). Além disso, algumas características morfológicas podem ter a desvantagem de serem influenciadas, em maior ou menor 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 em nível de DNA, não sofrendo influência ambiental (WEISING et al. 1995).

#### **- Marcadores Moleculares**

Os marcadores do DNA foram inicialmente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 80 (SOLLER e BECKMANN, 1983). Podem ser evidenciados por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre sequências complementares de DNA, como no caso do “*Restriction Fragment Length Polymorphisms*” (RFLP) ou pela técnica de “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR). O grande potencial do uso de marcadores moleculares no melhoramento reside no fato de serem praticamente ilimitados em número, de fácil detecção e se comportarem como “caracteres” de herança simples e previsível, não sendo afetados pelo ambiente (ZIETKIEWICZ, 1994, ALZATE-MARIN et al. 2005).

Os programas de melhoramento genético em plantas tem tido impactos significantes na produção agrícola. Apesar do sucesso acumulado desses programas, ganhos adicionais na eficiência do melhoramento podem ser obtidos por meio de aplicação de tecnologias moleculares. Dentre as diferentes tecnologias moleculares está o estudo do polimorfismo do DNA que se tornou uma área de pesquisa ativa nas principais espécies agronômicas e plantas-modelo. Os marcadores moleculares, neste contexto, tem se mostrado úteis tanto

para auxiliar no melhoramento de plantas quanto para aumentar o entendimento da domesticação das culturas, da evolução das plantas e o conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos nas características de interesse agrônomo (FERRÃO et al 2013; SEEB et al. 2011; WEBER et al. 2009; CICERO et al. 2007).

Os marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Se um loco molecular apresenta segregação mendeliana este poderá ser considerado um marcador. Devido a isto, os marcadores de DNA podem ser utilizados no estudo de genética de populações, caracterização de bancos de germoplasma, mapeamento, como DNA *fingerprinting* ou para complementar os estudos de sistemática, dentre outros possíveis usos. Todavia, a opção pela adoção de uma destas técnicas deverá levar em conta aspectos tais como objetivo do estudo, as características apresentadas pelo material genético, a disponibilidade de estrutura física, de recurso financeiro e de tempo, os quais serão determinantes para a escolha do tipo de marcador a ser empregado (LOPES et al. 2007; OLIVEIRA, 2010).

Os bancos de germoplasma são de suma importância, pois colocam à disposição dos pesquisadores ampla fonte de recursos genéticos, que podem fornecer genes que conferem adaptação a diferentes estresses abióticos e resistência a inúmeras pragas e doenças. Entretanto, os acessos conservados em bancos de germoplasma às vezes são pouco utilizados devido a uma série de dificuldades e deficiências, tais como falta de documentação (passaporte), falta de descrição adequada e falta de avaliação das coleções, o que limita a ação de melhoristas (MORETZSOHN et al. 2009; GEPTS, 2006).

Estudo com marcadores moleculares permite avaliar a variabilidade genética em um germoplasma ao nível do DNA, permitindo também associar as plantas em grupos por similaridade e dessa forma refletir as semelhanças, ou diferenças, entre os genótipos a partir de uma amostra direta do genoma; entretanto, esses trabalhos têm sido baseados no uso de marcadores dominantes, como RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*). A análise de similaridade em plantas perenes pode auxiliar o melhoramento genético, pois permite identificar precocemente genótipos mais ou menos semelhantes aos parentais e formar combinações

gênicas diferentes das encontradas nos genitores (OLIVEIRA et al. 2010; RAO e RILEY, 2008; BRESSAN, 2005).

Uma caracterização precisa de germoplasma é essencial nos programas de melhoramento para a proteção de cultivares e no controle da produção de mudas. Marcadores moleculares vêm substituindo ou complementando a caracterização morfológica e agrônômica tradicional, uma vez que são virtualmente ilimitados, cobrem todo o genoma, não são influenciados pelo ambiente e, particularmente em caso de árvores frutíferas, com período juvenil longo, reduz o tempo consumido para a caracterização de novos híbridos (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001).

#### - Marcadores Moleculares tipo ISSR

Os marcadores mais conhecidos identificados por hibridização são o RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) e minissatélites ou locos de VNTR (*Variable number of tandem repeat*), sendo este último também utilizado em amplificação. Os mais usados em amplificação são os marcadores RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) e os microssatélites ou SSR (*Simple sequence repeats*). Recentemente, dois marcadores baseados em amplificação estão sendo amplamente utilizados: AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) e os ISSR (*Inter-simple sequence repeat*) (FALEIRO, 2007).

Os ISSRs (*Inter-simple sequence repeats*) são marcadores arbitrários altamente informativos, *multilocos*, correspondentes a microssatélites produzidos por amplificação da reação em cadeia de polimerase utilizando um único iniciador (POWELL et al. 1996). Apresentam alto polimorfismo, não requerem conhecimento prévio do sequenciamento do genoma, possuem maior reprodutibilidade e, além disso, são de custo relativamente baixo (ZIETKIEWICZ et al. 1994). A técnica de ISSR é baseada na amplificação de regiões (100-3000 pb) orientadas inversamente, espaçadas proximamente aos microssatélites oferecendo ampla cobertura de regiões neutras no genoma (REDDY et al. 2002). Cita-se como desvantagem a dominância do marcador (ZIETKIEWICZ et al. 1994; GOODWIN, 1997).

Os *primers* ISSR podem estar usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3'. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que o genoma não apresente a

sequência repetida ou existe uma deleção ou uma inserção que modifique a distância entre as repetições. Para os *primers* ancorados na posição 5', polimorfismos ocorrem também devido às diferenças no comprimento do microsatélite. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente. Embora os ISSRs sejam marcadores dominantes, eles possuem a vantagem de analisar locos múltiplos em uma única reação (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001).

#### - Marcadores Moleculares tipo SSR

Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem de 1-6 nucleotídeos repetidos em *tandem*. Essas regiões são denominadas microsatélites, SSR (*Simple sequence repeats*) ou STR (*Short tandem repeats*) (BORÉM e CAIXETA, 2009). Durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA podem se separar e se associarem novamente de forma incorreta. Assim, seriam geradas cópias de trechos de DNA (alelos) com diferentes tamanhos ou número de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de repetição, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição (SCHLOTTERER e TAUTZ, 1992).

A distribuição, a frequência e a classe de microsatélites variam entre as diferentes classes de organismos, entretanto em plantas, os di-nucleotídeos mais comuns são AT/TA (SCHLOTTERER e TAUTZ, 1992). Quando um microsatélite é individualmente amplificado, usando-se um par de *primers* complementares às sequências únicas que o flanqueia, quase que invariavelmente apresenta extensivo polimorfismo para tamanho de bandas. A variação do tamanho dos produtos de PCR geralmente resulta da ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microsatélite (BORÉM, 2009). O principal mecanismo que origina os alelos nesses marcadores é o deslize (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação. Entretanto, essas sequências podem ser geradas também por recombinação, por meio do *crossing-over* desigual ou conversão gênica quando se trata de sequências repetidas em *tandem* mais longas (GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1999).

Independente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada microsatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de

grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia de PCR, fazem desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de diversidade em eucariotos. Essa hipervariabilidade dos microssatélites e, conseqüentemente, a possibilidade de utilizá-los em qualquer população segregante, os torna marcadores ideais para o mapeamento genético (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Todas essas características fazem desses marcadores ferramentas eficientes não só para o mapeamento genômico, mas também para estudos de ligação, identificação de genótipos, avaliação de purezas de sementes, utilização e conservação de germoplasma, estudo de diversidade, análise genética e de *locos* quantitativos (QTL), análise de *pedigree* e seleção assistida por marcadores. O alto nível de variação detectado com os marcadores microssatélites aumenta a resolução do estudo de genealogia e diversidade genética do germoplasma e reduz o número de marcadores requeridos para distinguir os genótipos. A grande limitação dos microssatélites é a sua espécie-especificidade, não sendo possível utilizar a estratégia de desenhos de “*primers* universais”, embora a transferibilidade para outras espécies seja possível (WANG et al. 2009; LISHAN et al., 2007).

Entretanto, ultimamente, com o avanço das técnicas de sequenciamento *high-throughput* e a queda nos preços de sequenciamento em geral, o uso de EST-SSRs (*Expressed sequence tags-simple sequence repeats*) vem se tornando uma realidade, uma vez que são marcadores SSRs provenientes do subproduto do sequenciamento e, portanto, sem nenhum custo adicional (THIEL et al. 2003).

O melhoramento convencional de inhame é demorado devido a vários fatores, dentre eles, o longo ciclo de crescimento. Marcadores moleculares são cada vez mais utilizados para estudar a diversidade genética de espécies silvestres e cultivadas de inhame. Os mais usados para esse objetivo têm sido AFLP, RAPD, SSR (ZHOU, 2008; MIGNOUNA et al. 2003; MIGNOUNA et al. 2002). Marcadores microssatélites têm sido desenvolvidos e utilizados para caracterizar a diversidade genética de coleções de germoplasma de CTCRI (Índia) e CIRAD (França) de *D. alata*, dentro da estrutura de um projeto em colaboração financiado pelo Indo-French Centre for the Promotion of Advanced Research (IFCPAR) (ABRAHAM e ARNAU, 2007). Atualmente esses marcadores

são utilizados para selecionar genitores geneticamente distantes de forma a maximizar a heterozigosidade e heterose nas progênies. A caracterização da coleção básica (*core collection*) de inhame do IITA com SSR, também está sendo procedida (ARNAU et al. 2010 in press).

Estudos com marcadores moleculares são necessários para um melhor entendimento da variabilidade genética dessas espécies e melhor esclarecimento sobre a relação dos grupos taxonômicos, visto a grande importância socioeconômica que essas espécies exercem na agricultura tradicional no Brasil e no mundo.

#### **- Diversidade Genética utilizando Análises Multivariadas**

Há duas formas de se inferir sobre a diversidade genética, sendo a primeira de natureza quantitativa e a outra natureza preditiva (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Os métodos preditivos têm sido bastante utilizados, sobretudo pelo fato de que, ao se basearem em diferenças morfológicas e moleculares dos genótipos, dispensam a obtenção das combinações híbridas entre eles, o que é vantajoso, especialmente quando o número de genótipos cujas diversidades se deseja conhecer é elevado (CARVALHO et al. 2003). Por esses métodos as informações múltiplas de cada cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representa a diversidade existente no conjunto de acessos estudados (FARIA, 2009).

Estudos que envolvem a divergência em plantas têm sido realizados frequentemente, com base em descritores botânicos, morfológicos e agrônômicos, por não apresentarem custos elevados (DIAS et al. 1997). No entanto, as interpretações desses dados têm, habitualmente, sido feitas por análises univariadas, o que gera dificuldades na obtenção das estimativas de divergência e, conseqüentemente, na seleção de indivíduos desejáveis para intercruzamentos, pois diferenças existentes entre grupos ou populações não depende de uma única variável e sim de um conjunto delas. Assim, as técnicas multivariadas têm se mostrado úteis, por avaliar o indivíduo em vários aspectos e proporcionar uma visão geral de cada acesso (CRUZ, et al. 2004).

Em análise de agrupamento, podem-se utilizar variáveis quantitativas ou qualitativas. As variáveis quantitativas referem-se a quantidades e podem ser medidas em uma escala numérica. As variáveis qualitativas referem-se a dados

não numéricos, ou seja, não são passíveis de mensuração. Podem subdividir-se em variáveis qualitativas ordinais ou nominais. Variáveis qualitativas ordinais são aquelas que definem um ordenamento, uma hierarquia ou uma escala (AMARAL, et al. 2010). Para esse tipo de variável podem ser associados valores numéricos, para cada categoria e os mesmos podem ser analisados como se fossem variáveis quantitativas discretas (SNEATH e SOKAL, 1973). As variáveis qualitativas nominais são aquelas que por sua vez não definem qualquer ordenamento ou hierarquia. As variáveis qualitativas nominais podem ser binárias ou multicategóricas. As qualitativas binárias são aquelas que apresentam dois resultados possíveis, presença ou ausência de uma determinada característica. As variáveis qualitativas são ditas multicategóricas quando existem mais de duas categorias ou classes mutuamente exclusivas (AMARAL JÚNIOR, et. al. 2010).

As medidas de dissimilaridade em variáveis qualitativas multicategóricas, isto é, de características morfológicas atribuídas, são comumente determinadas utilizando a distância de Cole-Rogers *et al.* (1997), onde as características, que normalmente não podem ser ordenadas, são classificadas em escalas, podendo então ser analisados como características quantitativas discretas (CRUZ; CARNEIRO, 2003). Em variáveis binárias (dados moleculares) pode-se utilizar: o coeficiente de Jaccard; coeficiente de Nei e Li; coeficiente de Ochia; coeficiente de coincidência simples, dentre outros. O procedimento para avaliar a diversidade genética entre acessos a partir de dados moleculares utiliza variáveis binárias, sendo avaliada a presença e ausência de marcas (FARIA, 2009).

De acordo com Cruz e Carneiro (2003) as estimativas de dissimilaridade atendem aos objetivos do melhorista, por quantificarem e informarem sobre o grau de similaridade ou de dissimilaridade entre pares de indivíduos. Entretanto, quando o número de acessos é relativamente grande, torna-se inviável o reconhecimento de grupos homogêneos pelo exame visual das estimativas de distância. Devido a isso os acessos semelhantes são reunidos com o uso de técnicas de agrupamento a partir da medida de dissimilaridade escolhida. O agrupamento entre os acessos ocorre de forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARRO, E. G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatol. bras.** 30(4), 2005;

ABRAHAM K, ARNAU, G. Use of DNA Markers for Genetically Improving the Productivity, Palatability, Storability and Dry Matter Content of Tubers of Greater Yam. In Mid-term report of IFCPAR Project Number 3000-B1. **New Delhi**, India: IFCPAR. 26 pp. 2007.

ABRAHAM, K.; NAIR, P.G. Floral Biology and artificial pollination in *Dioscorea alata* L. **Euphytica** v.48, p.45-51, 1986.

ABRAMO, M.A. **Taioba, cará e inhame**. São Paulo: Ícone, p. 65-80. 1990.

AGARWAL, M.; SHRISVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.27, p.617-631, 2008.

AKORODA, M.O., CHHEDA, H.R. Agro-botanical and species relationships of Guinea Yams. *Tropical Agriculture*, **Trinidad**, v.60, p.242-248, 1983.

AMARAL JUNIOR, A.T.; VIANA, A.P.; GONÇALVES, L.S.A.; BARBOSA, C.D. **Análise multivariada no melhoramento de plantas**. In: Telma Nair Santana Pereira. (Org.). *Germoplasma: Conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas*. Viçosa: Arca, p. 205-250. 2010

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

ARNAU, G.; ABRAHAM, K.; SHEELA, M.N., CHAIR, H.; SARTIE, A.; ASIEDU, R. Yam. Capítulo de Livro em elaboração. Petit Bourg, Guadeloupe: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), 2010 (In press);

AYENSU, E.S., AND COURSEY, D.G. Guinea yams: the botany, ethnobotany, use and possible future of yams in West Africa. **Econ. Bot.** 26: 301–318, 1972.

BENIN, G.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; MARCHIORO, V. S.; LORENCETTI, C.; KUREK, A. J.; SILVA, J. A. G.; CRUZ, P. J.; HARTWIG, I.; SCHMIDT, D. A. M. Comparisons among dissimilarity measures and multivariate statisticals as criterions for directing hibridizations in oat. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.4, p.657-662, 2003.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 532p, 2009.

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 new basic chromosome number in the Dioscoreae. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.113, n.3, p. 439-451, 2006.

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

BRETTING, P. K. and WIDRLECHNER, P. M. Genetic markers and plant genetic resource management. **Plant Breeding Review**, v. 13, p. 11-86, 1995.

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.

CARVALHO, L. P.; LANZA, M. A.; FALIERE, J.; SANTOS, J. W. Análise da diversidade genética entre acessos do banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.10, p.1149-1155. 2003.

CEREDA, M.P. Importância das tuberosas tropicais. In: Carmo, C.A.S. (Ed.) **Inhame e taro: Sistema de produção familiar**. João Pessoa: EMEPA, p. 27-32, 2002.

CHAIR, H.; PERRIER, X.; AGBANGLA, C.; MARCHAND, J.L.; DAINOU, O.; NOYER, J.L. Use of spSSRs for the characterization of yam phylogeny in Benin. **Genome**, Ottawa, V.48, p.674-684, 2005.

CHU, E. P. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Espécies nativas e exóticas de *Dioscorea* utilizado como alimento no Brasil. **Econ.Bot.** v.45: 467-479, 1991  
CHU, E.P. FIGUEIREDO, R. C. L. Native and exotic species of *Dioscorea* used as food in Brazil. **Economic Botany**, v.45, n.4, p.467-479, 1991.

CÍCERO, E.A.S., PITELLI, R.A.3, SENA, J.A.D.4 e FERRAUDO, A.S Variabilidade Genética e Sensibilidade de Acessos de *Pistia Stratiotes* ao Herbicida Glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 25, n. 3, p. 579-587, 2007;

COLE-RODGERS, P.; SMITH, D. W.; BOSLAND, P. W. A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations using *Capsicum* as an example. **Crop Science**, v. 37, p. 1000 - 1002, 1997.

COURSEY, D. G. **Descriptors for yam (*Dioscorea* sp.)**, Rome, IBPGR Secretariat, p. 19, 1967.

CRUZ CD; CARNEIRO PCS. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Volume 2. **Viçosa: UFV**. 585p. 2003.

CRUZ, C. D. **Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Divergência genética**. In: Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. Métodos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 1997. v. 6, p. 287 - 324.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Divergência genética**. In: CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. (Ed.). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, v. 1, p. 377 - 413. 2004.

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; PILLAY, M.; AND ZOK, S. Ploidy variation in the cultivated yams (*Diocorea cayenensis- Dioscorea rotundata* complex) from Cameroon as determined by flow cytometry. **Euphytica**, Wageningen, v.119, p.301-307, 2001.

DANSI, A.; MIGNOUNA, H.D.; ZOUNDJIHEKPON, J.; SANGARE, A.; ASIEDU, R. & AHOUSSOU, N. Using isozyme polymorphism to assess genetic variation within cultivated yams (*Diocorea cayenensis- Dioscorea rotundata* complex) of the Republic of Benin. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.47, p.371-383, 2000.

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, F.M. Collecte d'ignames cultivées du Complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* au Benin. **Planta Genet. Res. Newslett.** 112: 81-85. 1997

DEGRAS, L. Quelques données sur la variabilité de descendance d'igname Cousse-couche *D. trifida*. In: VII<sup>E</sup> CONGRES SOC. INTER-CARAIBE POUR LES PLANTES ALIMENTAIRES (CFCS), 1969, Guadeloupe, **Anais...** Guadeloupe: INRA, p. 59-65, 1969.

DIAS, L. A. dos S.; KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, G. C. T. Divergência genética multivariada na preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao L.*) **Agrotrópica**, v. 9, p. 29 - 40, 1997

DINIZ FILHO, J. A. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 102, 2007.

FAO - **Food and Agriculture Organization of The United Nations**. 2005. Disponível em <http://www.fao.org>

FAO. **FAOSTAT 2011** Data base. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#anchor>. Acesso em 20 de janeiro. 2013.

FAO. **FAOSTAT 2012** Data base. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#anchor>. Acesso em: 17 de dezembro. 2012.

FARIA, P. N. **Avaliação de Métodos para a determinação do número ótimo de clusters em estudos de divergência genética entre acessos de pimenta**. 2009. 54p. Dissertação (Mestrado em Estatística Aplicada e Biometria). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2009.

FARIAS, R.H. de. **Classificação de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na base dos componentes principais**. Areia : UFPB,. 60p. (Trabalho de graduação). 1996

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODOHL, P.A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P. and HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 103-126, 1995.

FERRÃO, L. F.V; CAIXETA, E. T.; SOUZA, F. de F.; ZAMBOLIM, E. M.; CRUZ, C. D.; ZAMBOLIM, L.; SAKIYAMA, N. S. Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationships in *Coffea canephora*. **Plant Systematics and Evolution**. v.299, pp 225-238. 2013.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. Ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, p. 220, 1998.

GEPTS P. Plant genetic resources conservation and utilization: the accomplishments and future of a societal insurance policy. **Crop Science** v. 46: 2278-2292, 2006.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: evolution and applications**. New York: Oxford University Press, p. 34-41, 1999.

GOODWIN, S. B. The population genetics of *Phytophthora*. **Phytopathology** 87: 462-473, 1997.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica** 122: 81-89, 2001.

HAMON, P. AND TOURÉ, B. Characterization of traditional yam varieties belonging to the *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex by their isozymic patterns. **Euphytica**, Wageningen, v.46, p.101-107, 1990.

IPGRI/IITA. Descriptors for yam (*Dioscorea* ssp). Rome, Italy: **International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria/International Plant Genetic Resources Institute**, p. 61. 1997.

JATASRA, D. S; PARODA, R S. **Genetic divergence in wheat**. Indian Journal of Genetic, v. 43, p.63-67, 1983.

KIM, H. S.; WARD, R. W. Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) based on RFLPs and coefficient of parentage. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 3/4, p. 472 - 479, 1997.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops Cassava, sweet potato, yams and aroids**. Publ. CABI. 413p, 2009.

LISHAN, Z., YOULU, Y., JINGYI, W., XIAORUI, J., BINGZHI, H., YAOTING, W. Transferability of cotton SSR marker to *Musa*. **Molecular Plant Breeding**, v. 5, n. 5, p. 668-672, 2007.

LOPES, P.M.; BRITO, J. L.; GOMES, S.; MEIRINHOS, J.; SANTOS, L.; GUEDES-PINTO, H. RAPD e ISSR marcadores moleculares em *Olea europaea* L.: variabilidade genética e identificação de cultivares molecular. Genetic Resources and Crop Evolution. v. 54, pp.117-128, 2007.

LOPEZ-MONTES, A. **Yam breeding at IITA: achievements, challenges, and prospects, 2012**. Disponível em: <http://r4dreview.org/2012/05/yam-breeding-at-iita-achievements-challenges-and-prospects/>, acessado dia 07 de jan. 2013.

MATIOLI, S. R. **Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucleicos**. In: Matioli SR (Ed.). *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 202p, 2001.

MAXTED, N.; FORD-LLOYD, B.V. & HAWKES, J.G. (eds). **Plant genetic conservation: the in situ approach**. Chapman and Hall, London, 1997.

MESQUITA, A. S. INHAME-Dioscorea cayennensis Lam. – E TARO – Colocasia esculenta (L.) Schott. – Cenários dos mercados brasileiro e internacional. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO, 2. 2002. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, v.1p. 215-238, 2002.

MIGNOUNA, H D.; ABANG, M. M.; ONASANYA, A. and ASIEDU, R. Identification and application of RAPD markers for anthracnose resistance in MIGNOUNA, H. D.; ABANG, M. M. and ROBERT ASIEDU, R. Harnessing modern biotechnology for tropical tuber crop improvement: Yam (Dioscorea spp.) molecular breeding. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 2 pp. 478-485, 2003

MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA**. *Biotechnol Ciênc Des*, n.5, p.14-17, 1998.

MONTALDO, A. *Cultivo de raíces y tubérculos tropicales*. Lima: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas dela OEA, p. 91-127, 1999.

MONTALVÁN, R.; FARIA, R. T. Capítulo 3: Variabilidade genética e germoplasma. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Editora UEL, p. 27-38. 1999.

MORETZSOHN, M. C.; BARBOSA, A. V. G.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; CRISTIANE TEIXEIRA, C.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GUIMARÃES, P. M.; PEREIRA, R. W; LOPES, C. R.; CAVALLARI, M. M.; JOSÉ FM VALLS, J. F. M.; BERTIOLI, D. J.; AND GIMENES, A. M. A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. **BMC Plant Biology**. 2009;

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, 2005.

OLIVEIRA, A. C. Construção de Mapas Genéticos em Plantas. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998

OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARVALHO, F. M. C.; LUCAS FERRAZ DOS SANTOS, L. F. S.; COSTA, J. L.; AMORIM, V. B. O.; DANTAS, J. L. L. Polymorphic microsatellite marker set for *Carica papaya* L. and its use in molecular-assisted selection. **Euphytica**, v. 173, pp.279-287, 2010.

OLIVEIRA, F. J. M.; **Tecnologia de produção do inhame (*Dioscorea cayennensis* L.) pelo sistema de formação de mudas e transplântio**. 2010. 56p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

OPARA, L.U. Onions: Post-harvest operations in developing countries. INPhO Compendium, **FAO**, Rome (in press), 2003.

OPARA, L.U. Yam storage. In: Bakker-Arkema et al. (eds). CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume IV Agro Processing. **The American Society of Agricultural Engineers**, St. Joseph, MI, p. 182-214, 1999.

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. Dioscoreaceae e Araceae: Aspectos taxonômicos, Etnobotânicos e Espécies nativas com Potencial para Melhoramento Genético. In: II simpósio nacional sobre as culturas do inhame e do taro. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, p. 39-53. 2002.

PEDRALLI, G. Distribuição geográfica e taxonômica das famílias Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. In: Carmo, C.A.S. **Inhame e taro**: sistema de produção familiar. Vitória, ES: Incaper, p.15-26, 1990.

PEDRALLI, G. O inhame, esse desconhecido. **Ciência Hoje**, v.8, n. 46, p. 58-62. 1988.

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

PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P.; FILOUX, D.; VERNIER, P.; MELO-FILHO, P.A.; ALMEIDA, H.S.M. & XAVIER, A.S. Plantas de inhame em Pernambuco e Paraíba apresentam infecções simples e mista por potyvírus e badnavírus. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.S 309, 2006.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, M. F.; ANDRADE, G. P. Doenças do caupi. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 3, p. 215-216, 2005.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; CHAZ ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**. v. 2, pp 225-238, 1996

QUEROL, D. Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido: abordagem sócio-econômica. Rio de Janeiro: AS-PTA, p. 206. 1993.

RAO VR; RILEY KW. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Genetic Resources Newsletter** v.97: 3-20, 2008.

REDDY, M.P.; SARLA, N. & SIDDIQ E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.

RITZINGER, R. **Aspectos fitossanitários da cultura do inhame**. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. p.34. (Documento 105).

SADIK, S.; OKEREKE, O.U. A new approach to improvement of yam *Dioscorea rotundata*. **Nature**, London, v.254, p. 134-135, 1975.

SANTOS, E. S. dos. **INHAME (*Dioscorea* sp) Aspectos Básicos da Cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, p. 158. 1996.

SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S. Tendência a perspectiva da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste Brasileiro. In: SIMPOSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., João Pessoa, 1988. **Anais**. João Pessoa: EMEPA – PB, p.22-31, 1988,

SANTOS, E.S. **Cultura do inhame (*Dioscorea* spp.)**. João Pessoa; EMEPA-PB, SEBRAE, p.9, 2002.

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, v. 53, p.121-130, 2005.

SCHLÖTTERER, C. & TAUTZ, D.. Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests interchromosomal exchanges drive concerted evolution. **Current Biol.** 4: 777–783, 1994;

SCHLÖTTERER, C. and TAUTZ, D. **Slippage synthesis of simple sequence DNA**. **Nucleic Acids Res.** 20: 211–215, 1992.

SEEB, J. E.; CARVALHO, G.; HAUSER, L.; NAISH, K.; ROBERTS, S.; SEEB, L. W. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. **Molecular Ecology Resources**, 2011.

SILVA, A. A. **Cultura do Cará da Costa**. Fortaleza: Instituto de Pesquisas Agronômicas da Secretária de Agricultura de Pernambuco, p. 66, 1971.

SILVA, A.A. Cultura do cará da Costa. Fortaleza, CE. Banco do Nordeste do Brasil. 66p. 1971.

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

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOLLER, M. & JS, BECKMANN. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theor.appl.Genet.**67:. 25-33, 1983;

STUDART, M. T. **Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP**. 2001. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

THIEL, T., W. MICHALEK, R.K. VARSHNEY, and A. GRANER. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor. Appl. Genet.** 106:411-422. 2003.

TOSTAIN, S. AGBANGLA, C.; SCARCELLI, N. MARIAC, C. DAINOU, O.; BERTHAUD, J. AND PHAM, J.L. Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Rome, v.5, n.2, p.71-81, 2007.

VALLS, J. F. M. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, SP, 1998. p. 106-128, 1998.

VAN BEUNINGEN, L. T.; BUSEH, R. H. Genetic diversity among North American spring wheat cultivars: I. Analysis of the coefficient of parentage matrix. **Crop Science**, v. 37, p. 570 - 579, 1997

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

VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAMANATHA RAO, V. Genetic Characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: **THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY**. Turin, p. 121-128. 2005.

WANG, J.Y., ZHENG, L.S., HUANG, B.Z., LIU, W.L., WU, Y.T. Development, characterization, and variability analysis of microsatellites from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Genetic Resources Crop Evolution**, 2009, DOI: 10.1007/s10722-009-9493-4.

WEBER, J. C.; LARWANOU, M.; ABASSE, T. A.; KALINGANIRE, A. Growth and survival of *Prosopis africana* provenances related to rainfall gradients in the West African Sahel. **For Ecol Manag.** 2009

WEISING, K. **DNA fingerprint in plants and fungi**. New York: CRC Press, p. 322, 1995.

ZHOU F, BADILLO-CORONA JA, KARCHER D, GONZALEZ-RABADE N, K PIEPENBURG, BORCHERS A-MI, MALONEY AP, KAVANAGH TA, GRAY JC, BOCK R) High-level expression of HIV antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. **Plant Biotechnol.** v 6. pp.897-913. 2008

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. & LABUDA, D. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored poly**. 1994.

## **CAPITULO 1**

### **CARACTERIZAÇÃO DO GERMOPLAMA DE INHAME POR MEIO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS**

## **CARACTERIZAÇÃO DO GERMOPLAMA DE INHAME POR MEIO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS.**

Autora: Janáira Lopes dos Santos Carneiro  
Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-orientador: Cláudia Fortes Ferreira  
Co-orientador: Ricardo Franco Cunha Moreira

**RESUMO:** A coleção de germoplasma de inhame (*Dioscorea spp*), mantida pela UFRB foi reunida por meio de expedições de coleta em diferentes Regiões do Nordeste. A pesquisa com recursos genéticos vegetais é essencial tanto para a conservação da diversidade genética, quanto para o estudo da divergência entre acessos; base para programas de melhoramento. Com o objetivo de conhecer a variabilidade morfológica mantida nesse germoplasma, foram avaliados 38 acessos de inhame, utilizando-se 28 características morfológicas. Com base nos dados aferidos, foi estimado o nível de entropia dos caracteres, a dissimilaridade genética dos acessos e, posteriormente, os indivíduos foram agrupados pelo método de agrupamento UPGMA. Os acessos de inhame estudados foram divididos em quatro grupos distintos em que o agrupamento hierárquico reuniu os acessos conforme as espécies botânicas (*D. trifida*; *D. rotundata*; *D. cayenensis*; *D. alata* e *D. bulbifera*) evidenciando uma elevada variabilidade genética entre os grupos e reduzida variabilidade dentro de cada grupo. O valor do coeficiente de correlação cofenético entre a matriz de agrupamento e a matriz de distância foi de 0,92; valor altamente significativo. Os caracteres com as maiores entropias foram: diâmetro do caule, número e forma dos tubérculos, mostrando elevada variabilidade para estes caracteres. Entretanto as demais características, a maioria, obtiveram entropias com valores considerados como intermediários e baixos, o que representa reduzida variabilidade para esses caracteres. Essas informações levam à necessidade de estudos de prospecção do inhame como coleta de um maior número de indivíduos e em locais diferenciados.

**Palavras chave:** Dissimilaridade; entropia; variabilidade

## CHARACTERIZATION OF YAM GERMLASM USING MORPHOLOGICAL DESCRIPTOS

Author: Janáira Lopes dos Santos Carneiro  
Advisor: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-advisor: Cláudia Fortes Ferreira  
Co-advisor: Ricardo Franco Cunha Moreira

**ABSTRACT:** The yam (*Dioscorea* spp.) germplasm collection kept at the UFRB, was created by collection expeditions in different regions of the Northeast. Research with plant genetic resources are essential for genetic diversity conservation as well as studies of diversity between accessions; basic studies considering genetic breeding programs. The objective of the present work was to assay the morphological variability maintained in this germplasm bank. Thirty-eight yam accessions were evaluated using 28 morphological characteristics. The level of entropy of the characteristics and the genetic dissimilarity of the access, were calculated and the accessions were clustered by the UPGMA method. The yam accessions studied were divided into 4 distinct groups according to their botanical species (*D. trifida*; *D. rotundata*; *D. alata* and *D. bulbifera*) showing genetic variability. The cophenetic correlation coefficient between the cluster matrix and the distance matrix was 0.92\*\*, considered highly significant. The characteristics with greatest entropy were: stem diameter, number and shape of tubers. The remaining characteristics obtained intermediary and low entropy values, which shows reduced variability for these characteristics. This information demonstrates the need of prospection studies in yams with collections of a larger number of accessions in many different locations

**Key-words:** Dissimilarity, entropy, variability

## INTRODUÇÃO

A variabilidade fenotípica encontrada em uma determinada espécie pode ser de duas origens: variação devido ao ambiente e devido a diferenças genéticas. A existência de variabilidade genética é a base do melhoramento genético de plantas.

Com o crescente aumento da erosão dos recursos genéticos vegetais, a preocupação principal, por parte do melhorista, é com a redução ou perda da variabilidade das espécies cultivadas e a extinção dos parentes silvestres, bem como de variedades locais, o que pode gerar o estreitamento da base genética (HALLAUER; MIRANDA FILHO, 1988). A vulnerabilidade resultante do estreitamento da base genética só pode ser evitada com a ampliação da variabilidade, a qual depende do uso dos recursos genéticos disponíveis, ou seja, do germoplasma da espécie (CASALI, 1969).

Uma das etapas mais importantes para a conservação dos Recursos Genéticos é o estabelecimento de uma coleção de acessos da espécie a ser trabalhada por meio da implantação de Banco de Ativo Germoplasma (BAG). O germoplasma conservado serve como um reservatório de genes que podem ser acessados pelo melhorista em programas de melhoramento na busca de melhores genótipos, com o intuito de desenvolver variedades produtivas e resistentes e ou tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos. No entanto, o uso adequado do germoplasma de uma espécie só é possível mediante seu conhecimento, o que pode ser feito por meio de caracterização morfológica e ou molecular.

O inhame (*Dioscorea* spp) é reconhecido como uma das hortaliças mais cultivadas no Brasil em sistema de agricultura familiar, onde desempenha importante papel socioeconômico principalmente na Região Nordeste do Brasil (OLIVEIRA, 2002). Os principais estados produtores dessa cultura encontram-se nessa região, onde são cultivados mais de 90% da produção brasileira de espécies comestíveis de inhame. Espécies com finalidade farmacológica são cultivadas nas regiões Sul, Centro Sul, Sudeste, Oeste e Norte (COELHO, 2002).

A exploração do inhame constitui uma alternativa viável para a agricultura nordestina, isso porque nas zonas produtoras dessa região, encontram-se condições edafoclimáticas favoráveis para o desenvolvimento e produção em

caráter altamente econômico dessa cultura. Soma-se a isso o grande potencial de expansão de sua área de cultivo, possibilitando maior produção e aumento na exportação para os grandes centros consumidores do sul e para o exterior.

O inhame produz tubérculos de alto valor nutritivo e energético, que são utilizados na alimentação de todas as classes da sociedade brasileira (MESQUITA, 2002). Dessa forma, a cultura possui um elevado potencial econômico (RIZZINI; MORS, 1995), com cerca de 25 espécies utilizadas na alimentação humana. Seus tubérculos são ricos em diversas vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina), vitamina A, vitamina C (ácido ascórbico) e carboidratos (amido principalmente) além de apreciáveis teores de proteína e de gordura (OLIVEIRA et al. 2007).

Apesar da importância que a cultura do inhame representa para o negócio agrícola nordestino, sua produtividade ainda continua baixa, em comparação com a dos países africanos como a Nigéria, que sozinha é responsável por 75% da produção mundial da cultura. Dentre os principais fatores responsáveis por essa baixa produtividade pode ser citados: o uso de tubérculos-sementes de qualidade agrônômica inferior (desuniformidade no tamanho e na maturação, apresentando ferimentos e contaminação por nematoides e fungos), o manejo inadequado da cultura, do solo e da água, a baixa fertilidade do solo e as irregularidades climáticas (BRITO et al. 2011).

A criação de novas cultivares de inhame resistentes a doenças e com características agrônômicas superiores que atendam aos produtores pode ajudar a contornar a maioria dos problemas da cultura. No entanto, o melhoramento genético só é possível se houver variabilidade genética disponível. Assim, justifica-se a implantação, caracterização e conservação de uma coleção de acessos de *Dioscorea spp*, que tem por finalidades reunir, manter a variabilidade genética e buscar genótipos mais adaptados para atender as necessidades dos agricultores e, principalmente, do mercado atual (LOPES-MONTES, 2012).

Estudos que envolvem a divergência em plantas têm sido realizados frequentemente, com base em descritores botânicos, morfológicos e agrônômicos, por não apresentarem custos elevados (DIAS et al. 1997). No entanto, as interpretações desses dados têm, habitualmente, sido feitas por análises univariadas, o que gera dificuldades na obtenção das estimativas de

divergência e, conseqüentemente, na seleção de indivíduos desejáveis para intercruzamentos, pois diferenças existentes entre grupos ou populações podem não ser dependentes de uma única variável e sim de um conjunto delas. Cruz et al. (2004) consideram que as técnicas multivariadas têm se mostrado úteis por avaliar o indivíduo em vários aspectos e proporcionar uma visão holística de cada acesso.

Na análise de divergência genética, vários métodos multivariados podem ser aplicados, como componentes principais, variáveis canônicas e métodos aglomerativos. O método aglomerativo depende do cálculo das medidas de dissimilaridade provenientes de variáveis quantitativas e qualitativas, pois cada genótipo constitui-se um grupo inicial, que se une em etapas posteriores, segundo suas similaridades, em grupos, de tal forma que haja homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos (CROSSA; FRANCO, 2004).

Basicamente os métodos de agrupamento envolvem duas etapas: a primeira refere-se ao cálculo das medidas de distância ou de similaridade (ou dissimilaridade); e a segunda, a utilização de uma técnica de agrupamento para formação dos grupos. As diferentes medidas de distância ou de similaridade (ou dissimilaridade) são calculadas em função do tipo de variável que se está avaliando. Cruz et al. (2004) apresenta os procedimentos para estimar essas medidas com base em variáveis quantitativas (distância Euclidiana), variáveis quantitativas com repetição (distância generalizada de Mahalanobis), variáveis qualitativas binárias (índices de Jaccard, Nei e Li e Sorensen-Dice) e variáveis qualitativas multicategóricas (Cole-Rodgers et al. 1997).

O presente trabalho objetivou caracterizar acessos da espécie *Dioscorea spp.* presentes no BG-inhame da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) por meio de descritores morfológicos para detecção da diversidade genética visando auxiliar o programa de melhoramento da cultura para a Região do Recôncavo da Bahia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O Banco de Germoplasma de inhame pertencente à UFRB foi implantado no Campo Experimental do Campus de Cruz das Almas-BA (12°40'19" latitude sul e 39°06'23" de longitude oeste de Greenwich e altitude média de 220 m). Segundo classificação de Köppen, o clima é do tipo tropical quente e úmido. A

precipitação média é de 1.224 mm por ano, a temperatura média anual de 24,5°C e a umidade relativa média do ar é de aproximadamente 82%. O solo é classificado como Latossolo Amarelo Álico Coeso, de textura argilosa e relevo plano (SACRAMENTO et. al. 2012).

Foram avaliados 38 acessos de inhame (Tabela 1) mediante o uso de 28 descritores; sendo dez relacionados às folhas, sete ao caule e 11 relacionados aos tubérculos (Tabela 2). As medidas de amostragens estabelecidas para os descritores morfológicos foram realizadas de acordo com as informações do catálogo de descritores do IPGRI (1997).

Após quatro a cinco meses do estabelecimento do germoplasma, foi realizada a caracterização da parte aérea (folhas e caules) (Figura 1), com o auxílio de fita métrica e paquímetro. Após nove meses, efetuou-se a caracterização dos tubérculos (Figura 2) com o auxílio de uma fita métrica e uma balança.

Tabela 1 - Acessos de inhame pertencentes ao Banco de Germoplasma – UFRB com suas respectivas espécies, procedência e origem. Cruz das Almas– BA - 2012

| <b>Número</b> | <b>Acesso</b> | <b>Espécie</b>       | <b>Procedência</b>      | <b>Local de Produção</b>               |
|---------------|---------------|----------------------|-------------------------|--|
| 1             | BGIN-85       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Toá Santo Antonio da Jaqueira -BA      |
| 2             | BGIN-86       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Sítio São Roque - São Felipe - BA      |
| 3             | BGIN-87       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Faz. Batatan Maragogipe - BA           |
| 4             | BGIN-88       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | St. Antonio da Jaqueira São Félix - BA |
| 5             | BGIN-89       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Boa Vista São Félix – BA               |
| 6             | BGIN-90       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Engenho de São João – BA               |
| 7             | BGIN-91       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Guapira Maragogipe – BA                |
| 8             | BGIN-92       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Faz. Vendinha São Felipe - BA          |
| 9             | BGIN-93       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Faz. dois irmãos Cruz das Almas - BA   |
| 10            | BGIN-94       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 11            | BGIN-95       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | São Felipe – BA                        |
| 12            | BGIN-96       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Maragogipe – BA                        |
| 13            | BGIN-97       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 14            | BGIN-98       | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 15            | BGIN-100      | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 16            | BGIN-101      | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 17            | BGIN-102      | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Faz. Copioba - São Felipe - BA         |
| 18            | BGIN-104      | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Faz. Sapezinho - São Felipe - BA       |
| 19            | BGIN-105      | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Piedade – Maragogipe - BA              |
| 20            | BGIN-107      | <i>D. cayenensis</i> | Feira de Cruz das Almas | Combê - Cruz das Almas - BA            |
| 21            | BGIN-108      | <i>D. alata</i>      | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 22            | BGIN-110      | <i>D. rotundata</i>  | Feira de Cruz das Almas | Maragogipe – BA                        |
| 23            | BGIN-111      | <i>D. alata</i>      | Cruz das Almas          | Serraria – Maragogipe - BA             |

## Continuação

|    |          |                     |                                |                              |
|----|----------|---------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 24 | BGIN-112 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Juazeiro              | Caruaru – PE                 |
| 25 | BGIN-113 | <i>D. alata</i>     | Feira de Juazeiro              | Caruaru – PE                 |
| 26 | BGIN-115 | <i>D. alata</i>     | Feira de Juazeiro              | Caruaru – PE                 |
| 27 | BGIN-116 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Juazeiro              | Paraíba                      |
| 28 | BGIN-117 | <i>D. alata</i>     | Feira de Juazeiro              | Paraíba                      |
| 29 | BGIN-118 | <i>D. bulbifera</i> | Cruz das Almas                 | Maragogipe – BA              |
| 30 | BGIN-119 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Santana               | -----                        |
| 31 | BGIN-120 | <i>D. bulbifera</i> | Cruz das Almas                 | Maragogipe – BA              |
| 32 | BGIN-121 | <i>D. rotundata</i> | Cruz das Almas                 | Batatan – Poerinha - BA      |
| 33 | BGIN-125 | <i>D. trifida</i>   | Feira de Valença               | Orobó Valença – BA           |
| 34 | BGIN-131 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Nazaré                | Maragogipe - São Felipe - BA |
| 35 | BGIN-133 | <i>D. rotundata</i> | Supermercado de Campina Grande | Região de Remijo – PB        |
| 36 | BGIN-135 | <i>D. rotundata</i> | Supermercado de Campina Grande | Região de Remijo – PB        |
| 37 | BGIN-136 | <i>D. rotundata</i> | Supermercado de Campina Grande | Região de Remijo – PB        |
| 38 | BGIN-137 | <i>D. rotundata</i> | Supermercado de Campina Grande | Região de Remijo – PB        |

---

Tabela 2- Descritores utilizados para a caracterização morfológica do Germoplasma de Inhame. Cruz das Almas – BA, 2012.

| <b>Descritores</b>  | <b>Classes Fenotípicas Analisadas</b>  |
|---|--|
| Cor de Caule  | 1- Verde; 2- Verde com faixas roxas; 3- Verdes com faixas marrons e 4- Roxo. |
| Presença de Asas  | 1-Presente; 2-Ausente  |
| Cor das Asas  | 1-Verde; 2-Roxa  |
| Presença de Acúleos   | 1-Presente; 2-Ausente  |
| Direção do Crescimento  | 1-Horário; 2-Anti-horário  |
| Diâmetro do caule (15 cm da base)   | 1- < 0,4 cm; 2- 0,4 – 0,6 cm; 3- >0,6 cm                                     |
| Formato do Caule (corte transversal)  | 1-Poligonal; 2-Redondo   |
| Posição das Folhas  | 1-Alternada; 2-Oposta  |
| Forma das Folhas  | 1-Cordata; 2-Sargitata   |
| Números de Lóbulos da Folha   | 1-Um; 2-Três   |
| Cor da Folha  | 1-Verde; 2-Verde escura; 3-Arroxeadada.                                      |
| Comprimento do Pecíolo  | 1- < 5 cm; 2- 5- 10 cm; 3- > 10 cm   |
| Cor do Pecíolo  | 1- Verde; 2- Verde com marrom; 3- Roxo                                       |
| Largura da folha na maior porção  | 1- < 10 cm; 2- 10 – 15 cm; 3- >15 cm   |
| Florescimento   | 1-Presente; 2-Ausente  |
| Tubérculos Subterrâneos   | 1-Presente; 2-Ausente  |
| Presença de rizóforos aéreo   | 1-Presente; 2-Ausente  |
| Distância entre a inserção do pecíolo na folha à extremidade superior da folha (folhas adultas) | 1- < 2 cm; 2- 2 – 4 cm; 3- > 2 cm  |
| Distância entre a inserção do pecíolo na folha à extremidade inferior da folha (folhas adultas) | 1- < 10 cm; 2- 10 – 15 cm; 3- >15 cm   |
| Presença de raízes nos rizóforos  | 1-Presente; 2-Ausente  |
| Número de tubérculos  | 1- Um; 2-Alguns; 3-Muitos  |
| Forma do tubérculo  | 1- Alongado; 2-Irregular; 3-Oval   |
| Posição de junção entre os tubérculos   | 1- Todo; 2-Superior  |
| Comprimento do tubérculo  | 1- <20 cm; 2- 20-40 cm; 3- >40 cm  |
| Largura do tubérculo (eixo maior)   | 1- <7 cm; 2- 7-12 cm ; 3- >12 cm   |
| Massa do tubérculo  | 1- <0,70 kg; 2- 0,70-1,50 kg; 3- 1,60-2,0 kg; 4- 2,10-3,0 kg; 5- >3,0 kg     |
| Cor da casca  | 1- Marrom; 2- Amarela  |
| Cor da polpa  | 1-Branca; 2-Amarela; 3-Roxa; 4-Roxo com branco; 5-Branco com roxo            |

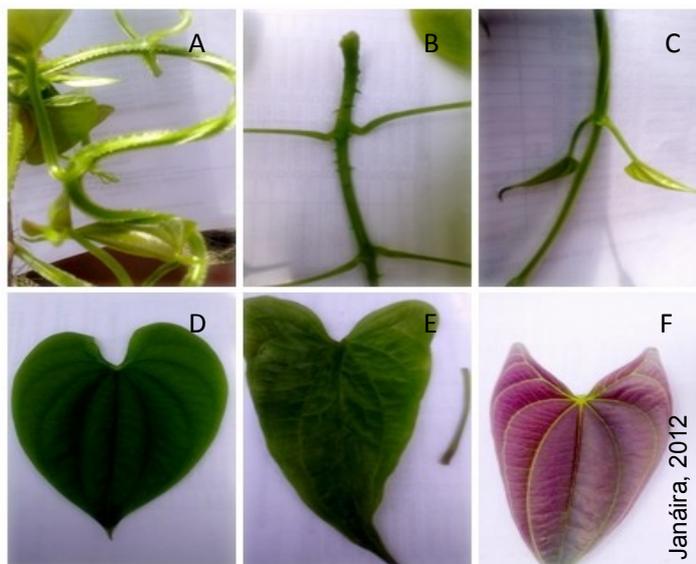


Figura 1: Em A observa-se a presença de asas no caule, B e C tipos do caule e em D, E e F tipos de folhas de acessos do BG-Inhame UFRB, Cruz das Almas, 2012.



Figura 2: Em A, B, C, D, E e F observa-se a diversidade dos tubérculos de inhame do BG-Inhame UFRB, Cruz das Almas, 2012.

Com base nos dados aferidos a campo, foi estimado o nível de entropia dos caracteres por meio do coeficiente de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) (SHANNON-WEAVER, 1949) pelo programa SAS (SAS/STAT software, 2006).

$$H' = \frac{\left[ N \ln(N) - \sum_{i=1}^S n_i \ln(n_i) \right]}{N}$$

Em que:

H' = Índice de Shannon-Weaver

ni=Número de indivíduos amostrados da i-ésima espécie.

N=número total de indivíduos amostrados.

S=número total de espécies amostradas.

ln=logaritmo de base neperiana.

A entropia de um determinado descritor será tão maior quanto maior for o número de classes fenotípicas desse e quanto mais homogêneo for o balanço entre a frequência dos acessos nas diferentes classes fenotípicas. Ou seja, para um descritor morfológico com duas classes fenotípicas, a maior entropia ocorrerá quando ambas as classes apresentarem 50 % dos acessos avaliados (VIEIRA, et al. 2007).

A matriz de distância foi gerada pelo programa R (R DEVELOPMENT, 2006). Os agrupamentos hierárquicos a partir da matriz de distância genética foram obtidos pelo método UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (Sneath e Sokal, 1973) no programa GENES (Cruz, 2008). Posteriormente, com base na matriz de dissimilaridade genética, a validação dos agrupamentos foi determinada por meio do coeficiente de correlação cofenético (r) (SOKAL; ROHLF, 1962). A significância do coeficiente de correlação cofenético foi calculada pelo teste de Mantel (1967) com 1000 permutações. O dendrograma foi gerado pelo programa STATISTICA 7.0 (STATISTICA, 2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os descritores qualitativos, as classes fenotípicas, a frequência percentual dos acessos em cada uma das classes e o nível de entropia estão apresentados na Tabela 3.

Com base em Jamago (2003), os valores do coeficiente de diversidade de Shannon-Weaver (H') são classificados como baixo (H' <0,50), médio ou intermediário (H'= 0,50-0,75) e alto (H' ≥ 0,75). Assim as variáveis que

apresentaram baixa entropia foram: presença de asas (0,44), cor das asas (0,44), formato do caule (0,44), posição das folhas (0,48), forma das folhas (0,33), número de lóbulos da folha (0,12), cor do pecíolo (0,46), distância entre a inserção do pecíolo na folha à extremidade superior da folha (folhas adultas) (0,39), distância entre a inserção do pecíolo na folha à extremidade inferior da folha (folhas adultas) (0,24), presença de rizóforos aéreos (0,21), presença de raízes nos rizóforos, posição de junção entre os tubérculos (0,21), comprimento do tubérculo (0,28), largura do tubérculo (0,21) e cor da polpa (0,34).

O nível de entropia pode ser utilizado para quantificar a variabilidade presente em descritores qualitativos por meio da observação das frequências relativas das classes para cada descritor avaliado. De acordo com Ledo et al. (2011), baixos valores para entropia estão associados a uma menor quantidade de classes fenotípicas para o descritor utilizado e a um maior desequilíbrio na proporção entre a frequência dos acessos nas diferentes classes fenotípicas

Tabela 3: Estatísticas descritivas para os descritores quantitativos utilizados na caracterização do Banco de Germoplasma de Inhame da UFRB. Cruz das Almas, 2012.

| <b>Descritor</b>           | <b>Classes</b>         | <b>Frequência %</b> | <b>Nível de entropia</b> |
|----------------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|
|                            | Verde                  | 84,21               | 0,51                     |
| Cor do caule               | Verde c/ faixas roxas  | 2,63                |                          |
|                            | Verde c/ faixas marrom | 13,16               |                          |
| Presença de Asas           | Presença               | 15,79               | 0,44                     |
|                            | Ausência               | 84,21               |                          |
| Cor das Asas               | Verde                  | 84,21               | 0,44                     |
|                            | Roxa                   | 15,79               |                          |
| Presença de Acúleos        | Presença               | 76,32               | 0,55                     |
|                            | Ausência               | 23,68               |                          |
| Diâmetro do Caule          | < 0,4 cm               | 50,00               | 0,80                     |
|                            | 0,4 – 0,6 cm           | 47,37               |                          |
|                            | > 0,6 cm               | 2,63                |                          |
| Formato do Caule           | Poligonal              | 15,79               | 0,44                     |
|                            | Redondo                | 84,21               |                          |
| Posição das Folhas         | Alternadas             | 18,42               | 0,48                     |
|                            | Opostas                | 81,58               |                          |
| Forma das Folhas           | Cordata                | 5,26                | 0,33                     |
|                            | Sargitata              | 92,11               |                          |
|                            | Lobulada               | 2,63                |                          |
| Número de Lóbulos da Folha | Um                     | 97,37               | 0,12                     |

|   |                  |       |      |
|---|------------------|-------|------|
|   | Três             | 2,63  |      |
| Cor da Folha  | Verde            | 34,21 | 0,64 |
|   | Verde Escura     | 65,79 |      |
| Comprimento do Pecíolo  | < 5 cm           | 13,16 | 0,59 |
|   | 5 – 10 cm        | 81,58 |      |
|   | > 10 cm          | 5,26  |      |
| Cor do Pecíolo  | Verde            | 86,84 | 0,46 |
|   | Verde com Marrom | 10,53 |      |
|   | Roxo             | 2,63  |      |
| Distância entre a inserção do pecíolo na folha à extremidade superior da folha (folhas adultas) | 2 – 4 cm         | 13,16 | 0,39 |
|   | > 2 cm           | 86,84 |      |
| Distância entre a inserção do pecíolo na folha à extremidade inferior da folha (folhas adultas) | < 10 cm          | 2,63  | 0,24 |
|   | 10 – 15 cm       | 94,74 |      |
|   | > 15 cm          | 2,63  |      |
| Largura da folha na maior porção  | < 10 cm          | 44,74 | 0,69 |
|   | 10 – 15 cm       | 55,26 |      |
| Presença de rizóforos aéreos  | Presença         | 5,41  | 0,21 |
|   | Ausência         | 94,59 |      |
| Presença de raízes nos rizóforos  | Presença         | 5,41  | 0,21 |
|   | Ausência         | 94,59 |      |
| Número de tubérculos  | Um               | 8,11  | 0,86 |
|   | Alguns           | 62,16 |      |
|   | Muitos           | 29,73 |      |
| Forma do tubérculo  | Alongado         | 54,05 | 0,94 |
|   | Irregular        | 10,81 |      |
|   | Oval             | 35,14 |      |
| Posição de junção entre os tubérculos   | Todo             | 5,41  | 0,21 |
|   | Superior         | 94,59 |      |
| Comprimento do tubérculo  | < 20 cm          | 91,89 | 0,28 |
|   | 20 - 40 cm       | 8,11  |      |
| Largura do tubérculo (eixo maior)   | 7 -12cm          | 5,41  | 0,21 |
|   | > 12cm           | 94,59 |      |
| Peso do tubérculo   | < 0,70Kg         | 91,89 | 0,28 |
|   | 0,70 - 1,50Kg    | 8,11  |      |
| Cor da casca  | Marrom           | 29,73 | 0,61 |
|   | Amarela          | 70,27 |      |
| Cor da polpa  | Branca           | 89,19 | 0,34 |
|   | Amarela          | 10,81 |      |

As variáveis que apresentaram valores intermediários de entropia foram: cor do caule (0,51), presença de acúleos (0,55), cor da folha (0,64), comprimento do pecíolo (0,59), largura da folha na porção maior (0,69) e cor da casca (0,61). Os maiores valores de entropias foram diâmetro do caule (0,80), número de tubérculos (0,86) e formato do tubérculo (0,94) em função de apresentarem elevado número de classes e um maior equilíbrio na proporção entre a frequência dos acessos nas diferentes classes fenotípicas, observado para a maioria dessas características, o que revela variabilidade genética entre os acessos estudados. As demais variáveis (16) apresentaram classes de baixa entropia sendo  $H' < 0,50$ , constituindo a maioria das características analisadas, revelando variabilidade genética entre os acessos estudados, principalmente para as variáveis de média e alta entropia, embora com formação de pequeno número de classes fenotípicas.

Menisa (2008) em estudos com as espécies *D. alata* e *D. esculenta*, observou uma alta diversidade pelo índice de Shannon-Weaver. Islam et al. (2011), encontraram para a coleção de inhame em Bangladesh, as maiores entropias para os descritores cor do pecíolo (0,94), presença de tubérculos aéreos (0,79), forma do tubérculo (0,91) e cor da polpa (0,85).

Otoo et al. (2009) estudando a variabilidade morfológica em 91 acessos do complexo *D. cayenensis-rotundata* em Gana, observaram os maiores valores de entropia para as características número de brotos, diâmetro do caule, comprimento do caule, número de tubérculos por planta, largura do tubérculo e número de inflorescência por planta.

Vieira et al. (2007) em estudo com mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), encontraram as maiores entropias para os descritores cor externa do caule, cor do pecíolo, forma do lóbulo central e cor da folha apical. Em estudos de divergência genética em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) Nucci (2011) aplicando o índice de diversidade genética de Shannon-Weaver encontrou uma baixa diversidade para os acessos considerados. Ledo et al. (2011) efetuando a caracterização morfológica da coleção de espécies de *Manihot spp* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, relataram os maiores valores de entropia para as variáveis cor do pecíolo (1,67), forma do lóbulo (1,59), cor externa do caule (1,25) e número de lóbulos (1,05).

O dendrograma de dissimilaridade, construído com 25 descritores em 38 acessos de inhame encontra-se da Figura 3. A direção do crescimento, o florescimento e a presença de tubérculos subterrâneos, por não discriminarem uma variação entre os acessos avaliados foram eliminados da análise da diversidade genética no germoplasma de inhame.

O agrupamento dos acessos foi com base no método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*). O ponto de corte baseou-se no valor da média da matriz de agrupamento, que foi de 0,26, discriminando um total de quatro grupos (Tabela 4), sendo que a média da matriz foi o método que melhor se ajustou para gerar o agrupamento dos acessos. O maior grupo foi o quatro, que agrupou 79,8% dos acessos, seguido pelo grupo três, (13,1%); grupo dois, (5,25%); e pelo grupo um, (2,63%) com apenas um representante.

Observou-se que o agrupamento hierárquico reuniu os acessos conforme a espécie botânica (*D. trifida*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. alata* e *D. bulbifera*). Possivelmente, isso ocorreu pelo fato dessas características serem em sua maioria qualitativas, portanto, controladas por poucos genes como também serem pouco afetadas pelo ambiente (FALCONER, 1981) o que contribui para a clara discriminação dos acessos de inhame em função da espécie (MARTINELLO et al. 2001).

O dendrograma exibiu um resultado satisfatório ao distinguir os grupos, porém, com baixo potencial em diferenciar os acessos dentro dos grupos denotando uma reduzida variabilidade genética dentro de cada espécie. Desta forma, torna-se necessário em estudos de prospecção de inhame coletar um maior número de indivíduos e em locais diferenciados. Observou-se ainda, que não houve uma associação entre a diversidade genética e a eco-geografia dos acessos (Tabela 5).

Resultados semelhantes foram observados por Sartie et al. (2012) estudando 60 acessos de *Dioscorea spp.* (*D. alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. dumetorum* (Kunth) e *D. rotundata* Poir.), onde ao avaliar a diversidade fenotípica envolvendo 23 características morfológicas, averiguaram que existe uma maior variabilidade entre as espécies do que dentro das espécies.

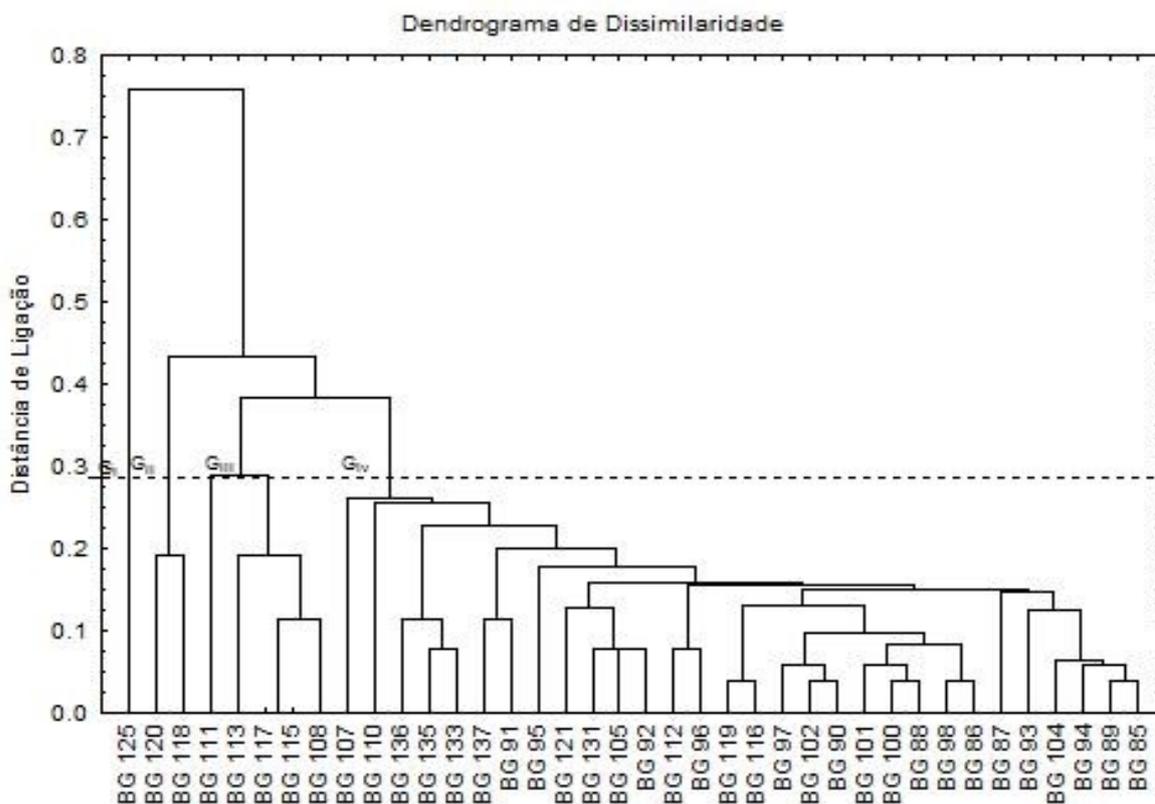


Figura 3: Dissimilaridade Genética entre 38 genótipos de inhame, com base em 26 descritores morfológicos, empregando o Coeficiente de Similaridade de Cole-Rodgers, e o método de agrupamento UPGMA.

Tabela 4 - Agrupamento dos acessos pelo método UPGMA

| Grupos | Acessos  |
|--------|--|
| 1      | 125  |
| 2      | 120, 118   |
| 3      | 111, 113, 117, 115, 108  |
| 4      | 107, 110, 136, 135, 133, 121, 137, 91, 97, 102, 90, 119, 116, 95, 93, 87, 101, 100, 88, 98, 86, 112, 96, 131, 105, 92, 104, 94, 89, 85 |

Tabela 5: Agrupamento dos genótipos de acordo com a classificação botânica

| GRUPOS | ESPÉCIES                                   |
|--------|--|
| GI     | <i>D. trifida</i>                          |
| GII    | <i>D. bulbifera</i>                        |
| GIII   | <i>D. alata</i>                            |
| GIV    | <i>D. rotundata</i> e <i>D. cayenensis</i> |

Norman et al. (2011) caracterizaram a variabilidade morfológica de 52 acessos de *Dioscorea sp.* em Serra Leoa, por meio de 28 características, com o uso de componentes principais e análise de *cluster*. Os resultados dessa análise possibilitou a formação de seis grupos, o que revelou a existência de divergência genética de cultivares de inhame que podem ser usados para o desenvolvimento de genótipos de alto rendimento e outras características desejadas, como resistência a pragas e doenças locais.

O valor da correlação cofenética, que mede o grau de ajuste entre a matriz de dissimilaridade e a matriz resultante da simplificação proporcionada pelo agrupamento foi de  $r = 0,92^{**}$ ; valor altamente significativo. Sartie et al. (2012) caracterizando por descritores morfológicos a diversidade genética em *Dioscorea spp.* obtiveram um coeficiente de correlação cofenético de  $r = 0,67$  alto e considerado adequado, uma vez que, de acordo com Vaz Patto et al. (2004),  $r > 0,56$  é considerado ideal, refletindo uma boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

O presente estudo demonstra a presença de diversidade genética interespecífica entre os acessos de *Dioscorea spp.* do banco de germoplasma da UFRB. Entretanto devem ser priorizadas novas coletas e novos trabalhos de caracterização, a fim de diversificar e ampliar as possibilidades de uso do germoplasma em programas de melhoramento da espécie. Os resultados obtidos nesse estudo serão utilizados como ferramenta para auxiliar o programa de melhoramento genético e conservação do inhame na Região do Recôncavo da Bahia.

## CONCLUSÕES

- A análise dos caracteres utilizando o índice de diversidade de Shannon-Weaver foi eficiente na avaliação da dissimilaridade entre os acessos de *Dioscorea spp.*
- Existe divergência genética interespecífica entre os acessos de *Dioscorea spp.* no banco de germoplasma da UFRB com formação de quatro grupos, porém reduzida variabilidade dentro de cada espécie.
- A presença de baixa entropia para a maioria dos descritores avaliados demonstra uma reduzida variabilidade genética nos acessos para esses descritores.
- É necessário realizar estudos de prospecção do inhame com coleta de um maior número de indivíduos e em locais diferenciados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, T.T.; SOARES, L. S.; FURTADO, M. C.; CASTRO, A. A; CARNELOSSI, M. A. G. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado. **Scientia Plena**, vol. 7, NUM. 6. 2011.

CASALI, V.W.D. Banco de germoplasma de hortaliças. **Seminário do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia**. Viçosa, MG: UFV, 1969. 8 p. (Mimeografado).

COELHO, R. S. B. Resistência Genética a Doenças na Cultura do Inhame (*Dioscorea* spp). In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2002, João Pessoa, PB. **Anais...João Pessoa**, PB: EMEPA – PB,v.2, p. 112-114. 2002.

COLE-RODGERS, P.; SMITH, D. W.; BOSLAND, P. W. A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations using *Capsicum* as an example. **Crop Science**, v. 37, p. 1000 - 1002, 1997.

CROSSA, J.; FRANCO, J. Statistical methods for classifying genotypes. **Euphytica**, v. 137, pp. 19-37, 2004.

CRUZ, C. D. **Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Divergência genética**. In: CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. (Ed.). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2004. v. 1, p. 377 - 413.

DIAS, L. A. dos S.; KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, G. C. T. Divergência genética multivariada na preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.) **Agrotropica**, v. 9, p. 29 - 40, 1997.

FALCONER, D. S. Introduction to quantitative genetics. 2.ed. London, **Longman**, 340p, 1981.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA, J.B. Germplasm. In: HALLAUER, A.R.; MIRANDA, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2. ed., Cap. 11, p.375-396, 1988.

IPGRI/IITA. Descriptors for yam (*Dioscorea* spp). Rome, Italy: **International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria/International Plant Genetic Resources Institute**, p. 61. 1997.

ISLAM, M. D. T. CHOWDHURY, R.U., AFROZ, R. RAHMAN, S. and HAQUE, M. D. M. Characterization and maintenance of yam (*dioscorea* spp) Germplasm. **Bangladesh J. Agril. Res.** V.36n.4, p.605-621, 2011.

JAMAGO, J.M. Morpho-agronomic and molecular diversity of the Philippine mungbean (*Vigna radiata* L.) germplasm, **Philippine Journal of Crop Science** University of the Philippines Los Banos, The Philippines, p.174, 2003.

LEDO, C. A. da S. *et al.* Caracterização morfológica da coleção de espécies silvestres de Manihot (Euphorbiaceae – Magnoliophyta) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. [recurso eletrônico] - Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011 – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003; 53).

LOPEZ-MONTES, A. **Yam breeding at IITA: achievements, challenges, and prospects, 2012**. Disponível em: <http://r4dreview.org/2012/05/yam-breeding-at-iita-achievements-challenges-and-prospects/>, acessado dia 07 de jan. 2013.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, Birmingham, v.27, n.2, p.209-220, 1967.

MARTINELLO, G.E.; LEAL, N.R.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PEREIRA, M.G.; DAHER, R.F. Divergência genética em acessos de quiabeiro com base em

marcadores morfológicos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 52–58, 2001.

MENISA, A. A. Assessment of genetic diversity in wild *Dioscorea* sp. "Buga" through morphological and cytological characterization. **University of the Philippines Los Banos**, pagination/collation xii, 138 leaves. 2008.

MESQUITA, A. S. INHAME-*Dioscorea cayenensis* Lam. – E TARO – *Colocasia esculenta* (L.) Schott. – Cenários dos mercados brasileiro e internacional. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO, 2002. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, v.1, p. 215-238, 2002.

NORMAN, P.E. TONGOONA P. AND SHANAHAN P.E. Diversity of the morphological traits of yam (*Dioscorea* spp) genotypes from Sierra Leone. **Journal of Applied Biosciences**. v 45. pp 3045– 3058, 2011.

NUCCI, S. M. **Diversidade genética em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) identificada por marcadores SSR e ISSR**. 2011. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2011.

OLIVEIRA, A. P. Nutrição e época de colheita do inhame (*Dioscorea* sp.) e seus reflexos na produção e qualidade de tubérculos. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2002. João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: EMEPA-PB, v.1, p. 83-98, 2002.

OLIVEIRA, A. P.; BARBOSA, L. J. N; PEREIRA, W. E.; SILVA, J. E. L.; OLIVEIRA, A. N. P. Produção de tubérculos comerciais de inhame em função de doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 073-076, 2007.

OTOO, E. AKROMAH, R. KOLESNIKOVA-ALLEN, M. ; ASIEDU, R. Ethno-botany and morphological characterisation of the yam pona complex in Ghana. **African Crop Science Society**, Vol. 9. pp. 407 – 414, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. A language and environment for statistical computing. Vienna: **R Foundation for Statistical Computing**, 2006.

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

SACRAMENTO, A. S.; SOUZA D. R.; SANTOS, D. W. F. N. Potencialidades de espécies lenhosas nativas para produção madeireira, cultivadas em solos degradados. **Scientia Plena**. v. 8, n. 4. 2012.

SARTIE, A. ASIEDU, R. FRANCO, J. Genetic and phenotypic diversity in a germplasm working collection of cultivated tropical yams (*Dioscorea* spp). **Genet Resour Crop Evol** . v. 59. p.1753–1765. 2012.

SAS INSTITUTE. SAS Technical Report. **SAS/STAT software**: Changes and Enhancement, Release 9.1. 3, Cary NC: SAS Institute. 2006.

SHANNON, C.E. WEAVER, W. **A teoria matemática da comunicação**. A Universidade de Illinois. Urbana, Chicago, Londres. p 3-24. 1949.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 573p, 1973.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon** v.11p.33-40. 1962.

STATSOFT. **Statistica (data analysis software system)**. Version 7.1. 2005. DISPONIVEL EM : <[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)>. Acessado em : 20 FEV. 2013.

VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v.137, n.1, p.63-72, 2004

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. de F.; SILVA, M. S.; FALEIRO, F. G. **Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do cerrado acessada por meio de descritores morfológicos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 15p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 129).

## **CAPITULO 2**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA DE INHAME COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES**

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE INHAME COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES

Autora: Janáira Lopes dos Santos Carneiro  
Orientador: Sebastião de Oliveira e Silva  
Co-orientador: Cláudia Fortes Ferreira  
Co-orientador: Ricardo Franco Cunha Moreira

RESUMO: O presente estudo objetivou a caracterização, via marcadores microssatélites e ISSR, de 32 acessos do Banco de Germoplasma de Inhame, a fim de determinar o nível e a organização da diversidade genética na coleção. A caracterização dos acessos foi realizada utilizando 21 marcadores ISSR, e sete marcadores microssatélites (SSR). Dos iniciadores ISSR, 92,85% das marcas amplificadas foram polimórficas e quanto aos SSRs, todas as marcas amplificadas apresentaram polimorfismo. Os coeficientes que apresentaram um maior valor de dissimilaridade entre os acessos avaliados foram Jaccard, Ochiai e Nei e Li, sendo este último utilizado apenas para as análises dos marcadores microssatélites. Considerando os valores de distâncias genéticas, os acessos mais divergentes na caracterização com os iniciadores ISSR, foram BGIN110 e BGIN120, com distância genética de 0,76 e os acessos BGIN95 e BGIN97 foram os mais próximos geneticamente. Com os marcadores SSR, os acessos mais dissimilares foram BGIN108 e BGIN118, com distância genética de 1,0 e os mais próximos foram o BGIN85 e o BGIN87. Os agrupamentos foram obtidos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*), havendo discrepância quanto ao número de *clusters* formado, tanto em relação ao tipo do marcador molecular, quanto ao tipo do coeficiente empregado. Entretanto, não houve discrepância quanto ao agrupamento, uma vez que os indivíduos se agruparam de acordo com a classificação botânica. Os índices que apresentaram um maior valor do coeficiente de correlação cofenético (CCC) foram Jaccard, Ochiai e Nei e Li, com  $CCC \geq 0,90$ , evidenciando, portanto consistência nos agrupamentos. O valor do PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) para ambos os marcadores foi baixo. Entre os *primers* ISSR o PIC variou 0,11 – 0,28,

sendo que o ISSR-97 apresentou um maior conteúdo de informação de polimorfismo, e entre os SSR, o conteúdo de polimorfismo variou de 0,06 – 0,21, sendo que o iniciador Dpr3D06 foi que apresentou um maior conteúdo de informação de polimorfismo. O estudo revela que a identificação de grupos dissimilares variou em função do marcador utilizado, porém o poder de discriminação do marcador SSR foi mais consistente. Tanto os marcadores codominantes quanto os dominantes foram capazes de diferenciar os acessos e possibilitaram a identificação dos mais contrastantes. Por não considerarem a ausência conjunta de bandas os índices de Jaccard, Ochia e Nei e Li, apresentaram resultados mais consistentes do que os coeficientes de coincidência simples e Sokal e Sneath.

**Palavras chave:** Coeficiente de similaridade; polimorfismo; SSR e ISSR.

## GENETIC DIVERSITY IN YAMS USING MOLECULAR MARKERS

Author: Janáira Lopes dos Santos Carneiro

Adviser: Sebastião de Oliveira e Silva

Co-adviser: Cláudia Fortes Ferreira

Co-adviser: Ricardo Franco Cunha Moreira

**ABSTRACT:** The objective of the present study was to characterize 32 yam accessions from the yam germplasm bank using microsatellite and ISSR markers in order to determine the level of organization and genetic diversity of the collection. Characterization was carried out using 21 ISSR and 7 microsatellite SSR markers. 92.85% of the ISSR amplified fragments were polymorphic and all SSR fragments were polymorphic. The coefficients which presented higher dissimilarity distance values were Jaccard, Ochiai and Nei & Li, whereas the latter was used only for microsatellite data. Considering the higher values of genetic distances in the characterization using ISSR markers, the most divergent accessions were BGIN110 and BGIN 120, with genetic distance of 0.76 and accessions BGIN95 and BGIN97, the closest genetically. For the SSR markers, the most dissimilar accessions were BGIN108 and BGIN118, with genetic distance of 1.0 and accessions BGIN85 and BGIN87, showed no difference. Clusters were obtained by the UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*) method with discrepancies as to the number of clusters formed in regard to the type of marker as well as the type of coefficient used. However, there were no discrepancies as to cluster formation, where accessions grouped according to their botanical classification. The indices which presented the highest cophenetic correlation coefficient value (CCC) were Jaccard, Ochiai and Nei & Li, with  $CCC \geq 0,90$ , demonstrating consistency in the clusters. The average PIC (Polymorphism Information Content) values for both markers was low. Among the ISSR markers, PIC values varied from 0.11 to 0.28, whereas ISSR-25 presented a highest PIC, and among the SSR markers, the PIC varied from 0.06 to 0.21, whereas primer Dpr3D06 presented the highest PIC value. The study shows that both codominant and dominant markers were able to differentiate the accessions

and enabled the identification of the most contrasting for use in the genetic breeding program of the species and that the Jaccard, Ochia and Nei & Li indices presented more consistent results for not simultaneously considering the absence of bands.

**Key-words:** Similarity coefficient; polymorphism; SSR and ISSR.

## INTRODUÇÃO

A caracterização de germoplasma refere-se à mensuração e à documentação de características herdáveis da planta, as quais devem ser consistentes e expressas homogeneamente em diferentes ambientes. Por meio de estudo dessa natureza, é possível identificar os acessos de uma coleção e separá-los geneticamente. O grande problema enfrentado pela caracterização morfológica em comparação à molecular é a natureza quantitativa dos caracteres, que é fortemente influenciada pelo ambiente, e que depende da identificação e enumeração dos caracteres visíveis que muitas vezes são subjetivos para o avaliador. Já os marcadores moleculares revela o polimorfismo em nível de DNA entre diferentes indivíduos, referindo-se a regiões expressas ou não do genoma não havendo influencia do ambiente (AZEVEDO et al. 2010).

As pesquisas de variabilidade genética em inhame se baseiam, em sua grande maioria, na avaliação de caracteres agronômicos e descritores morfológicos (CASTRO et al. 2012; OLIVEIRA et al. 2012; SARTIE et al. 2012 MELO FILHO et al. 2000). No entanto, tais marcadores existem em número limitado, e sua expressão gênica pode estar sujeita às variações ambientais. Em contraste, os marcadores moleculares não são afetados pelo ambiente e dessa forma têm sido usados com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade contida em bancos de germoplasma (MARTINS, 2011; BENITEZ et al. 2011; SANTOS et al. 2012; EGESI et al. 2006).

A caracterização molecular é, portanto, de grande importância para a conservação *in situ* e *ex situ* e para os programas de melhoramento genético, pois permite a geração de uma serie de informações a respeito das características intrínsecas das espécies e da sua dinâmica populacional. Esses marcadores podem ser empregados sempre que necessário para o adequado uso e manejo de germoplasma e estudos de conservação da espécie (AZEVEDO et al. 2010).

Nesse aspecto, os genomas eucariotos possuem várias sequências simples repetidas, as quais consistem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem (LITT e LUTY, 1989). Essas regiões são denominadas de microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo o desenho de *primers* para ampliações

específicas desses locos, via reação em cadeia da polimerase. Essas ampliações tendem a mostrar extensivo polimorfismo, que é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (MORGANTE e OLIVIERI, 1993). Os SSRs se mostram como uma das classes de marcadores mais promissoras para a ampla utilização nos programas de melhoramento por serem marcadores codominantes e multialélicos e fornecerem elevado nível de informação genética por loco, podendo ser analisados a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, com o uso de pequena quantidade de DNA (SOUSA et al. 2011).

Os ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*) são outra classe de marcadores usados em estudos de polimorfismos e são baseados em microssatélites. Esses marcadores tem se mostrado como uma poderosa ferramenta para análise da diversidade e divergência genética, bem como para a caracterização de acessos e cultivares de diversas espécies (SILVA et al. 2012; AZEVEDO et al. 2011; SANTANA et al. 2010; ISSHIKI et al. 2008; CHARTERS e WILKINSON, 2000). Por se tratar de um marcador multiloco, que não requer conhecimento prévio do DNA a ser avaliado (GUPTA et al. 1994), o ISSR é uma técnica de baixo custo, de fácil uso e de grande reprodutibilidade (MATTHEWS et al. 1999) quando comparada a outros marcadores com base em PCR não específico como o RAPD (WOLFE e LISTON, 1998) e requer pouca infraestrutura em termos de equipamento de laboratório para execução dos experimentos. Vários trabalhos vêm utilizando marcadores do tipo ISSR para estudos de diversidade genética em acessos de bancos de germoplasma de diferentes culturas (DING, et al. 2013; NAYAK, et. al 2013; PATHAK, et al. 2012; THUL, et al. 2012; AZEVEDO et al. 2011; VIEIRA et al. 2007).

Há duas maneiras básicas de se inferir sobre a diversidade genética, sendo a primeira de natureza quantitativa e a segunda preditiva (CRUZ e CARNEIRO, 2004). Diversos conjuntos de dados têm sido utilizados para estudar a diversidade genética nas culturas, dentre esses, os mais importantes têm sido os dados de *pedigree*; seguidos pelos morfológicos; bioquímicos e por último àqueles baseados em marcadores de DNA (MOHAMMADI e PRASANNA, 2003). Os diversos conjuntos

de informações fornecem variáveis quantitativas, qualitativas, binárias e variáveis multicategóricas.

Os métodos preditivos de diversidade genética têm sido bastante utilizados, sobretudo pelo fato de que, ao se basearem em diferenças morfológicas, fisiológicas e moleculares dos genótipos, dispensam a obtenção das combinações híbridas entre eles, o que é vantajoso, especialmente quando o número de genitores cuja diversidade se deseja conhecer é elevado (CARVALHO et al. 2003). Por esses métodos, as informações múltiplas de cada cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade ou similaridade, que representam a diversidade existente no conjunto de acessos estudados.

As medidas de dissimilaridade comumente utilizadas em variáveis binárias (dados moleculares) são: coeficiente de Jacard; coeficiente de Nei e Li (1979); coeficiente de coincidência simples, dentre outros. Um dos procedimentos para se avaliar a diversidade genética entre acessos a partir de dados moleculares provenientes de marcadores SSR ou ISSR, é por meio do uso de variáveis binárias, onde se avalia a presença e ausência de marcas (CRUZ e CARNEIRO, 2004).

Os coeficientes de similaridade indicam a força de relação entre os indivíduos, fixando um valor comum aos mesmos (EVERITT, 1993). Esses coeficientes, tanto de similaridade quanto de dissimilaridade, são criados com o intuito de moldar situações especiais de interesse do pesquisador. Por este motivo, dispõe-se de uma ampla série de medidas. Uma análise das propriedades desses coeficientes ajuda a identificar alguns princípios gerais e encontrar o que melhor se ajuste aos interesses de uma pesquisa em particular (BUSSAB et al. 1990). Contudo, essa escolha não é trivial e os trabalhos, comumente, não justificam nenhuma escolha particular, notadamente para dados de marcadores moleculares. Tais coeficientes podem ser divididos em duas categorias: medidas de similaridade e medidas de dissimilaridade. Para a primeira categoria, quanto maior o valor observado, mais similares são os indivíduos; para a segunda, quanto maior o valor observado, menos similares são os indivíduos (MAYER, 2007).

O presente trabalho teve como objetivos caracterizar acessos de inhame utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR) e ISSR e propor critérios

para a determinação do melhor coeficiente de dissimilaridade a ser usado em estudos de diversidade genética da espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram avaliados 32 acessos de Inhame (Tabela 1) provenientes do Banco de Germoplasma de Inhame implantado no Campo Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus de Cruz das Almas-BA.

### Caracterização Molecular

A extração do DNA de inhame é bastante trabalhosa devido à presença de polifenóis que interferem com a molécula de DNA, dificultando a sua amplificação adequada, por isso, foram necessários alguns ajustes de protocolos. Testaram-se quatro metodologias, sendo três a partir do protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) com as seguintes modificações: a) as folhas coletadas ficaram no escuro e refrigeradas por 12 horas (Método I); b) foram utilizadas folhas liofilizadas (Método II), e c) utilizaram-se folhas frescas (Método III). No Método IV, utilizou-se a metodologia proposta por Sharma et al. (2008) com modificações (ANEXO I). A quantificação e o ajuste para concentração de trabalho ( $3,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) do material foi realizada em gel de agarose 1% sendo corados com brometo de etídio.

Foram testados 103 *primers* ISSR, sendo que 21 foram otimizados, devido a grande dificuldade de amplificação do material genético utilizado (Tabela 2). As reações de amplificações foram feitas para um volume final de 15  $\mu\text{L}$ , contendo os seguintes reagentes: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3),  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2,5 mM de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 2,0 mM iniciador,  $3,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de DNA genômico, uma unidade de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*®) e água purificada.

As amplificações foram conduzidas em Termociclador *Applied Biosystems* modelo Veriti 96 *well thermal cycler*, empregando-se a seguinte programação: um ciclo inicial de 2 min a 95°C, seguido de 39 ciclos de 1 min a 94°C, 50°C durante 1 min (temperatura de anelamento), 1 min a 72°C e 72 °C durante 10 min para extensão final pela Taq polimerase e 10°C  $\infty$ .

Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 2,5% sob condição-padrão, os produtos da amplificação corados com brometo de etídeo, visualizados por meio de luz UV e foto documentados pelo sistema Gel Logic 212 PRO – Nova Analítica, de foto documentação. Para fins de genotipagem, as bandas de boa resolução nos géis de agarose para os marcadores ISSR foram avaliadas como ausência (0) e presença (1) por se tratar de um marcador dominante.

Foram testados 13 pares de iniciadores SSR (Tabela 3), desenvolvidos por Obidiegwu et al. (2009). As reações para amplificação constaram de um volume final de 15  $\mu\text{L}$  contendo 3,0  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  de DNA genômico; 50,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM Tris/KCl, 100  $\mu\text{M}$  de dNTPs; 2,0 mM de cada iniciador e uma Unidade de Taq polimerase (*Invitrogen*®). As amplificações para otimizar a temperatura de anelamento e demais reações foram realizadas em termociclador *Applied Biosystems* modelo Veriti 96 *well thermal cycler*, empregando-se o seguinte programa: ciclo inicial de 2 min a 95°C, seguido de 39 ciclos a 94°C por 1min, (temperatura de anelamento variando de 48 a 58°C, de acordo com o iniciador), por 1 min, 1 min a 72°C, extensão final a 72°C por 10 min e temperatura final 10°C $\infty$ . Após as amplificações, os fragmentos foram separados em géis de agarose a 4%, sendo corados por brometo de etídeo e fotografados pelo sistema de foto documentação (Gel Logic 212 PRO – Nova Analítica).

Tabela 1- Acessos de inhame pertencentes ao Banco de Germoplasma – UFRB com suas respectivas espécies, procedência e origem. Cruz das Almas BA, 2012.

| Nº | Acesso   | Espécie             | Procedência             | Local de Origem                        |
|----|----------|---------------------|-------------------------|--|
| 1  | BGIN-85  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Toá Santo Antonio da Jaqueira - BA     |
| 2  | BGIN-87  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Faz. Batatan Maragogipe - BA           |
| 3  | BGIN-88  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | St. Antonio da Jaqueira São Félix - BA |
| 4  | BGIN-89  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Boa Vista São Félix – BA               |
| 5  | BGIN-90  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Engenho de São João – BA               |
| 6  | BGIN-91  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Guapira Maragogipe – BA                |
| 7  | BGIN-92  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Faz. Vendinha São Felipe - BA          |
| 8  | BGIN-93  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Faz. dois irmãos Cruz das Almas - BA   |
| 9  | BGIN-94  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 10 | BGIN-95  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | São Felipe – BA                        |
| 11 | BGIN-96  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Maragogipe – BA                        |
| 12 | BGIN-97  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 13 | BGIN-98  | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 14 | BGIN-101 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 15 | BGIN-108 | <i>D. alata</i>     | Feira de Cruz das Almas | Cruz das Almas – BA                    |
| 16 | BGIN-110 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Cruz das Almas | Maragogipe – BA                        |
| 17 | BGIN-112 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Juazeiro       | Caruaru – PE                           |
| 18 | BGIN-113 | <i>D. alata</i>     | Feira de Juazeiro       | Caruaru – PE                           |
| 19 | BGIN-115 | <i>D. alata</i>     | Feira de Juazeiro       | Caruaru – PE                           |
| 20 | BGIN-116 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Juazeiro       | Paraíba                                |
| 21 | BGIN-117 | <i>D. alata</i>     | Feira de Juazeiro       | Paraíba                                |
| 22 | BGIN-118 | <i>D. bulbifera</i> | Cruz das Almas          | Maragogipe – BA                        |
| 23 | BGIN-120 | <i>D. bulbifera</i> | Cruz das Almas          | Maragogipe – BA                        |
| 24 | BGIN-125 | <i>D. trifida</i>   | Feira de Valença        | Orobó Valença – BA                     |
| 25 | BGIN-126 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Nazaré         | Barro Branco Muniz Ferreira - BA       |

## Continuação

|    |          |                     |                                |                                 |
|----|----------|---------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 26 | BGIN-129 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Nazaré                | Santo Antonio de Jesus – BA     |
| 27 | BGIN-130 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Nazaré                | Estrada de Palma Jaguaripe - BA |
| 28 | BGIN-132 | <i>D. rotundata</i> | Feira de Aracaju               | Aracaju – SE                    |
| 29 | BGIN-133 | <i>D. rotundata</i> | Supermercado de Campina Grande | Região de Remijo – PB           |
| 30 | BGIN-135 | <i>D. rotundata</i> | Supermercado de Campina Grande | Região de Remijo – PB           |
| 31 | BGIN-136 | <i>D. rotundata</i> | Supermercado de Campina Grande | Região de Remijo – PB           |
| 32 | BGIN-137 | <i>D. rotundata</i> | Supermercado de Campina Grande | Região de Remijo – PB           |

---

Tabela 2 - Relação dos *primers* ISSR selecionados para a caracterização de 32 acessos do Banco de Germoplasma de Inhame – UFRB, Cruz das Almas-BA, 2012.

| Nº do primer | Nome do primer | Sequência <sup>-1</sup> | Ta (°C) <sup>-2</sup> |
|--------------|----------------|-------------------------|-----------------------|
| 12           | DiGA3'RC       | GAGAGAGAGAGAGAGARC      | 50                    |
| 24           | DiGT5'A        | AGTGTGTGTGTGTGTGT       | 50                    |
| 25           | DiGT5'C        | CGTGTGTGTGTGTGTGT       | 50                    |
| 32           | TriCAC5'CY     | CYCACCACCACCACCAC       | 50                    |
| 33           | TriCAG         | CAGCAGCAGCAGCAG         | 50                    |
| 34           | TriCAG3'RC     | CAGCAGCAGCAGCAGRC       | 50                    |
| 35           | TriCAG3'YC     | CAGCAGCAGCAGCAGYC       | 50                    |
| 36           | TriCAG5'CR     | CRCAGCAGCAGCAGCAG       | 50                    |
| 37           | TriCAG5'CY     | CYCAGCAGCAGCAGCAG       | 50                    |
| 39           | TriGTG3'RC     | GTGGTGGTGGTGGTGRC       | 50                    |
| 40           | TriGTG3'YC     | GTGGTGGTGGTGGTGYC       | 50                    |
| 41           | TriGTG5'CR     | CRGTGGTGGTGGTGGTG       | 50                    |
| 42           | TriGTG5'CY     | CYGTGGTGGTGGTGGTG       | 50                    |
| 47           | TriTGT5'CY     | CYTGTTGTTGTTGTTGT       | 50                    |
| 59           | TriAGA 3'RC    | AGAAGAAGAAGAAGARC       | 50                    |
| 83           | TriCTG 3'RC    | CTGCTGCTGCTGCTGRC       | 50                    |
| 90           | TriGAA 3'RC    | GAAGAAGAAGAAGAARC       | 50                    |
| 91           | TriGAT 3'RC    | GATGATGATGATGATRC       | 50                    |
| 93           | TriGAG 3'RC    | GAGGAGGAGGAGGAGRC       | 50                    |
| 97           | TriGCA 3'RC    | GCAGCAGCAGCAGCARC       | 50                    |
| 101          | TriGGA 3'RC    | GGAGGAGGAGGAGGARC       | 50                    |

<sup>-1</sup> R: (A, G); Y :(C,T); <sup>-2</sup>Ta: Temperatura de anelamento.

Tabela 3 - Relação dos *primers* microssatélites selecionados para a caracterização de 32 acessos do Banco de Germoplasma de Inhame-UFRB, Cruz das Almas, 2012.

| <b>Nome do Microssatélite</b> | <b>Forward (5' - 3')</b> | <b>Reverse (5' - 3')</b> | <b>Ta (°C)</b> | <b>Referência</b>       |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------|
| Da1F08                        | AATGCTTCGTAATCCAAC       | CTATAAGGAATTGGTGCC       | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| Dab2C05                       | CCCATGCTTGTAAGTTGT       | TGCTCACCTCTTTACTTG       | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| Dab2D08                       | ACAAGAGAACCGACATAGT      | GATTTGCTTTGAGTCCTT       | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| Dab2E07                       | TTGAACCTTGACTTTGGT       | GAGTTCCTGTCCTTGGT        | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| Dpr3B12                       | CATCAATCTTTCTCTGCTT      | CCATCACACAATCCATC        | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| Dpr3D06                       | ATAGGAAGGCAATCAGG        | ACCCATCGTCTTACCC         | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| Drp3F12                       | TCCCCATAGAAACAAAGT       | TCAAGCAAGAGAAGGTG        | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| Dpr3F04                       | AGACTCTTGCTCATGT         | GCCTTGTTACTTTATTC        | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| Da1A01                        | TATAATCGGCCAGAGG         | TGTTGGAAGCATAGAGAA       | 51             | Obidiegwu et. al (2009) |
| YM5                           | AATGAAGAAACGGGTGAGGAAGT  | CAGCCCAGTAGTTAGCCCATCT   | 58             | Obidiegwu et. al (2009) |
| YM13                          | TTCCCTAATTGTTCCCTCTTGTTG | GTCCTCGTTTTCCCTCTGTGT    | 58             | Obidiegwu et. al (2009) |
| YM15                          | TACGGCCTCACTCCAACACTA    | AAAATGGCCACGTCTAATCCTA   | 58             | Obidiegwu et. al (2009) |
| YM26                          | AATTCGTGACATCGGTTTCTCC   | ACTCCCTGCCACTCTGCT       | 58             | Obidiegwu et. al (2009) |

## Análise dos dados moleculares

Devido à natureza poliploide de algumas das espécies de inhame, as distâncias genéticas entre os acessos foram baseadas na codificação (1) para presença e (0) para ausência de bandas; tanto para o marcador molecular dominante (ISSR) quanto para o codominante (SSR).

Os coeficientes de similaridade analisados para os marcadores ISSRs foram: Jaccard, Ochiai, Sokal e Sneath e Coincidência Simples e para os microsatélites todos os citados anteriormente, com o incremento do coeficiente de Nei e Li (1979) (Tabela 4). As estimativas de similaridades ( $Sg_{ij}$ ) obtidas a partir desses coeficientes foram convertidas em medidas de dissimilaridade ( $Dg_{ij}$ ) por meio do complemento aritmético dos coeficientes utilizados ( $Dg_{ij} = 1 - Sg_{ij}$ ). Portanto, os coeficientes de dissimilaridade foram calculados com o *software* GENES versão 2009.7.0 (CRUZ, 2006), sendo geradas as matrizes de dissimilaridade para cada índice.

A análise de agrupamento entre os genótipos foi obtida pelo método das médias aritméticas de grupos não ponderados - UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*). Os dendrogramas foram construídos usando o programa computacional STATISTICA 7.0 (2005). O ponto de corte foi escolhido de acordo com a metodologia sugerida por MINGOTI (2005).

O coeficiente de correlação cofenética, que mede o grau de ajuste entre a matriz de dissimilaridade e a matriz resultante da simplificação proporcionada pelo agrupamento, foi calculado com o auxílio do *software* GENES versão 2009.7.0. (CRUZ, 2006) e os valores de PIC (*Polymorphism Information Content*) estimados pelo programa POWERMARKER (LIU e MUSE 2005).

Tabela 4: Coeficientes de similaridade utilizados no estudo de diversidade em *Dioscorea spp.*

| Coeficientes         | Expressão da Similaridade <sup>1</sup> |
|----------------------|--|
| Coincidência Simples | $a + d / a + b + c + d$                |
| Sokal & Sneath       | $2(a + d) / 2(a + d) + b + c$          |
| Jaccard              | $a / (a + b + c)$                      |
| Ochiai               | $a / \sqrt{(a + b)(a + c)}$            |
| Nei & Li             | $2a / 2(a + b + c)$                    |

<sup>1</sup>a=1,1; b=1,0; c= 0,1 e d= 0,0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### - Diversidade Genética por Marcadores Dominantes - ISSR

Foi amplificado um total de 168 bandas, a partir dos marcadores ISSR, pelos 21 iniciadores utilizados, dos quais 156 foram polimórficas (92,85% de bandas polimórficas). O número de bandas amplificadas variou de quatro para o *primer* 93 (TriGAG3'RC) a 19 *primer* 47 (TriTGT5'C) (Figura 1) com uma média de 7,0 bandas polimórficas por *primer*.

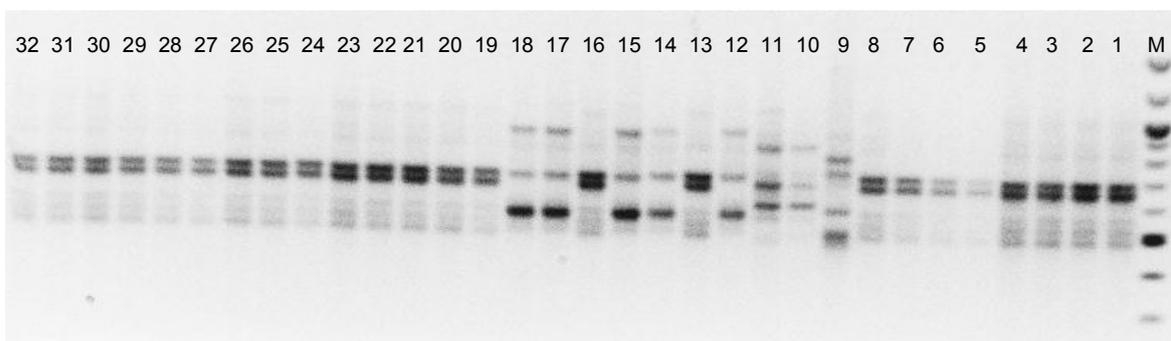


Figura 1: Perfil eletroforetico de acessos de inhame (1- 32) pertencentes ao BG-Inhame em gel de agarose 2,5% utilizando o iniciador ISSR TriCAG5'CR. (M) : Marcador – ladder de peso molecular 1 Kb (Invitrogen®), Cruz das Almas, 2012.

As análises das matrizes de dissimilaridade, obtidas pelos coeficientes de Jaccard, Ochiai, Sokal e Sneath e Coincidência Simples (ANEXO II), indicaram que os genótipos mais dissimilares em relação ao conjunto considerado, foram BGIN110 (*D. rotundata*) pertencente ao grupo G<sub>II</sub> e BGIN120 (*D. bulbifera*) do G<sub>I</sub>, cujos coeficientes de Jaccard e Ochiai expressaram distâncias de 0,72 e 0,56 respectivamente, para essas espécies. Todos os coeficientes mostraram que os genótipos BGIN95 e BGIN97 foram os mais próximos geneticamente, ambos do grupo G<sub>IV</sub>, pertencentes à espécie *D. rotundata*.

Em estudos com o inhame chinês (*D. opposita* Thunb) Zhou et al. (2008) utilizaram marcadores ISSR para avaliar a divergência genética e as relações entre 28 cultivares. Dos 44 *primers* ISSR utilizados, sete foram selecionados por sua reprodutibilidade, confiabilidade e alto polimorfismo, amplificando 65 marcas, sendo 54 (83,01%) polimórficas, sendo estimada uma diversidade genética de 0,3191. O resultado desse trabalho sugeriu que os iniciadores ISSR são ferramentas úteis para avaliar a divergência genética de inhame chinês

possibilitando gerar informações valiosas para auxiliar a seleção de acessos em futuros programas de melhoramento da espécie.

Considerando as diferentes espécies dos acessos do germoplasma (Tabela 2) e os agrupamentos gerados pelos dendrogramas (Figura 2), os resultados demonstraram não haver grandes discrepâncias na estrutura dos agrupamentos dos genótipos utilizando os coeficientes, de Jaccard e de Coincidência Simples, que apresentaram o mesmo número de *clusters* (quatro) ( $G_I$  – BGIN120 e BGIN118;  $G_{II}$  – BGIN117, BGIN115, BGIN113, BGIN110 e BGIN108;  $G_{III}$  – BGIN125 e  $G_{IV}$  – BGIN116, BGIN137, BGIN132, BGIN101, BGIN98, BGIN136, BGIN135, BGIN133, BGIN130, BGIN129, BGIN126, BGIN87, BGIN112, BGIN96, BGIN92, BGIN97, BGIN95, BGIN93, BGIN94, BGIN90, BGIN89, BGIN91, BGIN88 e BGIN85) e Ochiai e Sokal e Sneath, que formaram cinco *clusters* ( $G_I$  – BGIN120 e BGIN118;  $G_{II}$  – BGIN117;  $G_{III}$  – BGIN115, BGIN113, BGIN110 e BGIN108;  $G_{IV}$  – BGIN125;  $G_V$  – BGIN116, BGIN137, BGIN132, BGIN101, BGIN98, BGIN136, BGIN135, BGIN133, BGIN130, BGIN129, BGIN126, BGIN87, BGIN112, BGIN96, BGIN92, BGIN97, BGIN95, BGIN93, BGIN94, BGIN90, BGIN89, BGIN91, BGIN88 e BGIN85).

De modo geral, os agrupamentos ocorreram de acordo com a espécie (Tabela 5), à exceção do genótipo BGIN110, pertencente à espécie *D. rotundata*, que se agrupou ao *cluster*  $G_{II}$ , onde se encontram genótipos da espécie *D. alata*. Verificou-se que não houve uma correspondência geográfica em relação à similaridade entre acessos, já que genótipos de mesma origem foram alocados em grupos diferentes.

Os coeficientes de similaridade disponíveis para dados binários se baseiam na comparação entre o número de atributos comuns para um par de objetos e o número total de atributos envolvidos e tais coeficientes podem ser facilmente convertidos em coeficientes de dissimilaridade (MEYER, 2002). Os coeficientes de Jaccard e Ochiai apresentaram resultados consistentes de acordo com os valores da correlação cofenético, que mede a relação entre as matrizes de distâncias genéticas e a matriz de agrupamento (Tabela 6).

Meyer et al. (2004) verificaram em estudos de divergência genética em milho, que os coeficientes de Jaccard e Ochiai apresentaram resultados próximos, pois todos excluem as ocorrências negativas (0:0). Os autores sugerem ainda,

que os coeficientes que não consideram ausências dos fragmentos como evidências de homologia, são os mais indicados para a obtenção da matriz de dissimilaridade para marcadores dominantes.

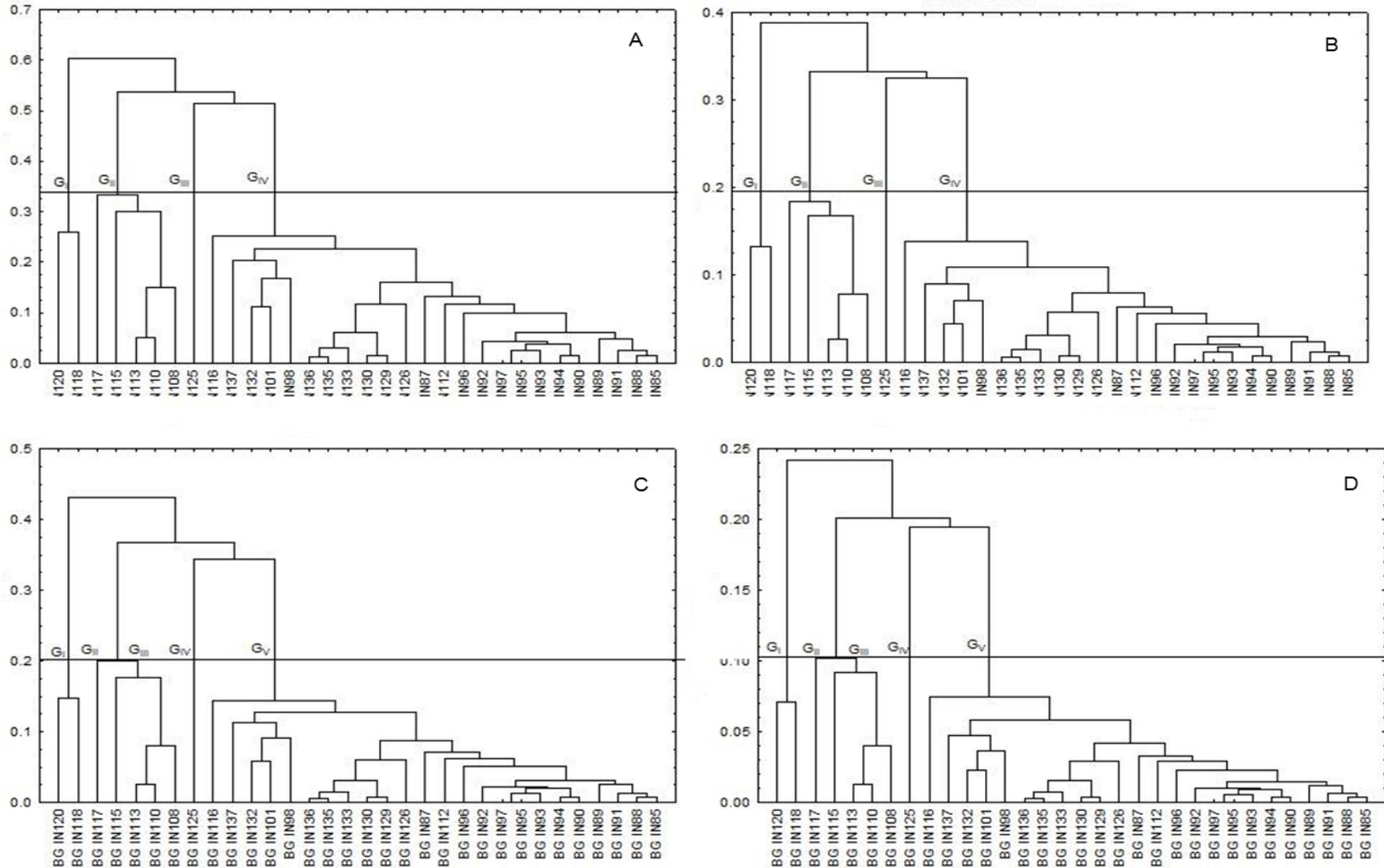


Figura 2: Dissimilaridade Genética entre 32 genótipos de inhame, com base em 21 marcadores moleculares ISSR e 156 bandas polimórficas, com o uso dos coeficientes de Jacard (A), Coincidência Simples (B), Ochiai (C) e Sokal e Sneath (D), utilizando o método de agrupamento

Os resultados obtidos assemelham-se aos de Ferrão et al. (2011), e de Meyer et al. (2004) que utilizando diferentes coeficientes de similaridade para análise de agrupamento em genótipos de café e de milho respectivamente, com base em marcadores moleculares dominantes (RAPD), verificaram que mesmo empregando distintos coeficientes à estrutura dos agrupamentos dos genótipos não houve alterações significativas.

Tabela 5: Agrupamento dos genótipos de acordo com as espécies pelo método UPGMA.

| <b>GRUPOS</b> | <b>ESPÉCIES</b>                       |
|---------------|---------------------------------------|
| GI            | <i>D. bulbifera</i>                   |
| GII           | <i>D. alata</i> e <i>D. rotundata</i> |
| GIII          | <i>D. trifida</i>                     |
| GIV           | <i>D. rotundata</i>                   |

Coeficientes: Jaccard e Coincidência Simples

| <b>GRUPOS</b> | <b>ESPÉCIES</b>                       |
|---------------|---------------------------------------|
| GI            | <i>D. bulbifera</i>                   |
| GII           | <i>D. alata</i>                       |
| GIII          | <i>D. alata</i> e <i>D. rotundata</i> |
| GIV           | <i>D. trifida</i>                     |
| GV            | <i>D. rotundata</i>                   |

Coeficientes: Ochiai e Sokal e Sneath.

Santana et al. (2011) estudando a divergência genética em umbu-cajazeira utilizaram 25 marcadores ISSR, os quais produziram um total de 249 bandas e a distância genética entre os acessos variou de 0,247 a 0,665, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. O alto grau de polimorfismo encontrado demonstrou a eficiência dos marcadores ISSR, que podem ser utilizados na caracterização molecular de germoplasma e em futuros trabalhos de melhoramento genético da espécie.

Estudando a caracterização do germoplasma de Cucurbitáceas a partir de iniciadores ISSR, Silva et al. (2012) constataram que esses marcadores foram eficientes na diferenciação dos acessos de melancia e melão, revelando alto nível de polimorfismo, com separação de grupos com divergências favoráveis à seleção de genitores promissores para uso em hibridações.

A análise das variáveis moleculares realizada com os coeficientes de Jaccard, Ochiai, Sokal e Sneath e de Coincidência Simples, apresentou o maior coeficiente de correlação cofenético entre as matrizes de agrupamento, com valor

de correlação de 0,87 (Tabela 6), revelando, portanto que os índices de Jaccard e Ochiai apresentaram um ótimo ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a suas matrizes originais.

Tabela 6: Índices de correlação cofenético e número de grupos formados em função dos coeficientes de similaridade provenientes da análise em 32 genótipos de inhame.

| <b>Coefficientes</b> | <b>Numero de Grupos</b> | <b>Índice de Correlação Cofenético (r)</b> |
|----------------------|-------------------------|--|
| Jaccard              | IV                      | 0,81                                       |
| Ochiai               | V                       | 0,87                                       |
| Sokal & Sneath       | V                       | 0,57                                       |
| Coincidência Simples | IV                      | 0,15                                       |

Conforme sugerem Vaz Patto et al. (2004), o coeficiente de correlação cofenético com  $r > 0,56$  é considerado ideal, refletindo uma boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento. Assim, infere-se que os resultados obtidos pelos coeficientes de correlação cofenético para os índices de Sokal e Sneath e coincidência simples, foram os de menor fidedignidade de associação na caracterização de acessos de inhame.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,11 para o iniciador ISSR-25 a 0,28 para o iniciador ISSR-97; com média de 0,18 (Tabela 7). Marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 medianamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos (BOTSTEIN et al. 1980). Neste estudo, observou-se que não houve resultados de PIC superior a 0,5. Dessa forma, o maior valor foi 0,28, considerando o *primer* ISSR-97 para os genótipos em estudo, como medianamente polimórfico.

Tabela 7: Iniciadores ISSR, nome do *primer*, número de marcas, conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

| <b>Nº do primer</b> | <b>Nome do primer</b> | <b>Nº de marcas</b> | <b>PIC</b> |
|---------------------|-----------------------|---------------------|------------|
| ISSR12              | DiGA3'RC              | 8                   | 0,15       |
| ISSR 24             | DiGT5'A               | 5                   | 0,14       |
| ISSR 25             | DiGT5'C               | 5                   | 0,11       |
| ISSR 32             | TriCAC5'CY            | 6                   | 0,17       |
| ISSR 33             | TriCAG                | 6                   | 0,15       |
| ISSR34              | TriCAG3'RC            | 7                   | 0,15       |
| ISSR 35             | TriCAG3'YC            | 10                  | 0,21       |
| ISSR 36             | TriCAG5'CR            | 8                   | 0,16       |
| ISSR 37             | TriCAG5'CY            | 7                   | 0,24       |
| ISSR 39             | TriGTG3'RC            | 6                   | 0,15       |

Continuação

|          |             |     |      |
|----------|-------------|-----|------|
| ISSR 40  | TriGTG3'YC  | 10  | 0,14 |
| ISSR 41  | TriGTG5'CR  | 6   | 0,21 |
| ISSR 42  | TriGTG5'CY  | 4   | 0,15 |
| ISSR 47  | TriTGT5'CY  | 19  | 0,20 |
| ISSR 59  | TriAGA 3'RC | 8   | 0,24 |
| ISSR 83  | TriCTG 3'RC | 8   | 0,12 |
| ISSR 90  | TriGAA 3'RC | 9   | 0,24 |
| ISSR 91  | TriGAT 3'RC | 10  | 0,25 |
| ISSR 93  | TriGAG 3'RC | 3   | 0,23 |
| ISSR 97  | TriGCA 3'RC | 5   | 0,28 |
| ISSR 101 | TriGGA 3'RC | 7   | 0,18 |
| Total    |             | 156 | -    |
| Média    |             | 7,0 |      |

#### - Diversidade Genética por Marcadores Codominantes – SSR

Dos 13 pares de iniciadores microssatélites testados, sete apresentaram amplificação satisfatória. O perfil eletroforético dos 32 acessos de inhame amplificados com o *primer* SSR-YM13, encontra-se na Figura 3.

Um total de sete marcadores foi amplificado. Todas as marcas apresentaram polimorfismo. O número de bandas variou de duas para os *primers* Dpr3D06, Drp3F12 e Da1A01 a cinco, para o iniciador Dpr3B12 com uma média 3,28 por marcador, com um total de 23 alelos.

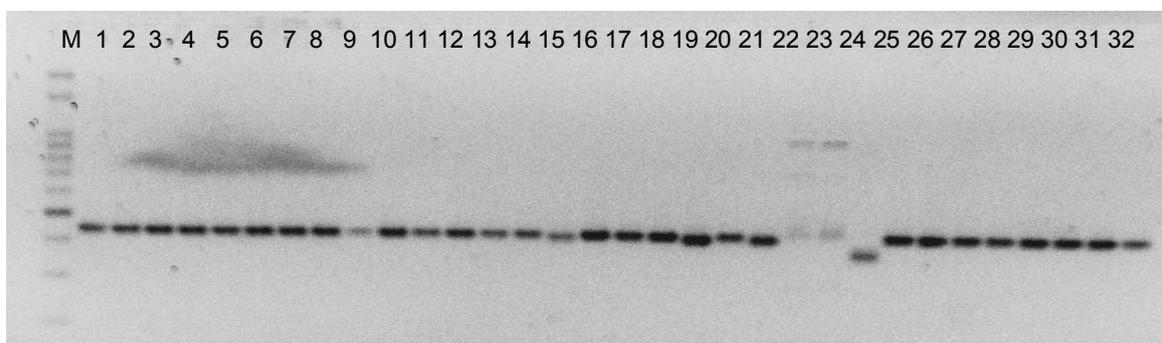


Figura 3: Perfil eletroforético em gel de agarose a 4%, dos fragmentos gerados pelo iniciador YM13 em genótipos do BG-inhame (1-32). Em (M) Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen®), Cruz das Almas, 2012.

Obidiegwu et al. (2009) avaliando a divergência genética em 89 acessos de *D. alata*, detectaram um total de 97 alelos, em que o número médio de alelos foi 7,46 por loco. Tostain et al. (2006) estudando a espécie *D. rotundata* Poir com dez iniciadores SSR, detectaram uma média de 8,4 alelos por loco. Siqueira et al. (2011), avaliando a divergência genética entre acessos de *D. alata* utilizaram

nove iniciadores SSR; um total de 47 alelos foi obtido. O número de alelos variou de 3 a 8, com uma média de 5,22 alelos por loco.

A dissimilaridade genética, obtida pelas matrizes de dissimilaridade (ANEXO III), estimada com base nos coeficientes de Jaccard, Ochiai, Sokal e Sneath, coincidência simples e Nei e Li, variou de 0 a 1. Analisando as diferentes espécies entre os acessos (Tabela 2) e os agrupamentos gerados pelos dendrogramas (Figura 4), os resultados obtidos revelaram não haver discrepância na estrutura do agrupamento dos indivíduos utilizando diferentes coeficientes de dissimilaridade, em que o número de *clusters* (quatro) foi igual para todos os coeficientes em que: (G<sub>I</sub>) – BGIN120 e BGIN118; G<sub>II</sub> – BGIN125; G<sub>III</sub> – BGIN117, BGIN115 e BGIN108 e G<sub>IV</sub> – BGIN133, BGIN137, BGIN136, BGIN132, BGIN130, BGIN129, BGIN128, BGIN116, BGIN113, BGIN112, BGIN110, BGIN101, BGIN98, BGIN97, BGIN96, BGIN95, BGIN94, BGIN93, BGIN92, BGIN9, BGIN90, BGIN89, BGIN88, BGIN87 e BGIN85. De modo geral, os agrupamentos ocorreram de acordo com a espécie (Tabela 8), à exceção do acesso BGIN113, pertencente à espécie *D. alata*, que se agrupou ao *cluster* G<sub>IV</sub>, onde se encontra genótipos da espécie *D. rotundata*. Verificou-se, portanto, que a origem dos acessos não influenciou a análise de agrupamento.

Tabela 8: Agrupamento dos genótipos de acordo com as espécies pelo método UPGMA.

| GRUPOS | ESPÉCIES                              |
|--------|---------------------------------------|
| GI     | <i>D. bulbifera</i>                   |
| GII    | <i>D. trifida</i>                     |
| GIII   | <i>D. alata</i>                       |
| GIV    | <i>D. rotundata</i> e <i>D. alata</i> |

Houve diferenças entre os valores de dissimilaridade entre os genótipos. Os resultados obtidos pelos índices de Sokal e Sneath e coincidência simples assemelham-se, uma vez que mostraram que os genótipos mais divergentes foram BGIN117 (*D. alata*) pertencente ao G<sub>III</sub> e o BGIN118 (*D. bulbifera*) alocado no G<sub>I</sub>, com distâncias de 0,50 e 0,66, respectivamente. Em contrapartida, os coeficientes de Jaccard, Ochiai e Nei e Li demonstraram que os genótipos mais dissimilares foram BGIN108 (*D. alata*) pertencente ao G<sub>III</sub> e BGIN118 (*D. bulbifera*) alocado no G<sub>I</sub>, em que os três índices mostraram uma divergência

máxima entre esses acessos. O menor valor de dissimilaridade foi apresentado entre os acessos BGIN85 e BGIN87; ambos da espécie *D. rotundata* e agrupados no G<sub>IV</sub>, para todos os cinco coeficientes, esses acessos são geneticamente próximos. Contudo, os coeficientes atribuem diferentes pesos aos valores das ocorrências e ausências conjuntas, bem como nas diferenças encontradas, o que influencia diretamente nos valores encontrados (FERRÃO et al. 2011).

Analisando a natureza dos coeficientes a partir de suas expressões (Tabela 5), pode-se observar que os coeficientes que apresentam propriedades comuns, mostraram-se mais relacionados, como se pode observar para os coeficientes de Jaccard, Nei e Li e Ochiai, que possuem a propriedade comum de não considerarem a ausência conjunta das características. Os coeficientes de coincidência simples e Sokal e Sneath por sua vez, consideram a ausência conjunta. Portanto, essas particularidades entre os índices podem estar influenciando na forma de agrupamento entre os genótipos devido à sensibilidade de cada coeficiente.

Sartie et al.(2012) em estudos de diversidade genética de germoplasma de inhame avaliando quatro espécies (*D. alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. dumetorum* (Kunth) e *D. rotundata* Poir) utilizaram 32 iniciadores SSR em 50 acessos. O número total de alelos identificados foi de 102, o qual variou 2-7 alelos por loco. A correlação cofenética foi  $r = 0,67$ , altamente significativa. Os autores sugerem que *D. rotundata* e *D. cayenensis* parecem ter co-evoluído a partir do mesmo parentesco, e podem ter sido separados como resultado de efeito de seleção por domesticação, ou pela G x A (interação genótipo x ambiente). Esse estudo revelou, portanto, que os marcadores microssatélites são ferramentas úteis para a análise genética entre espécies de inhame e que a diversidade genética foi maior entre que dentro da espécie.

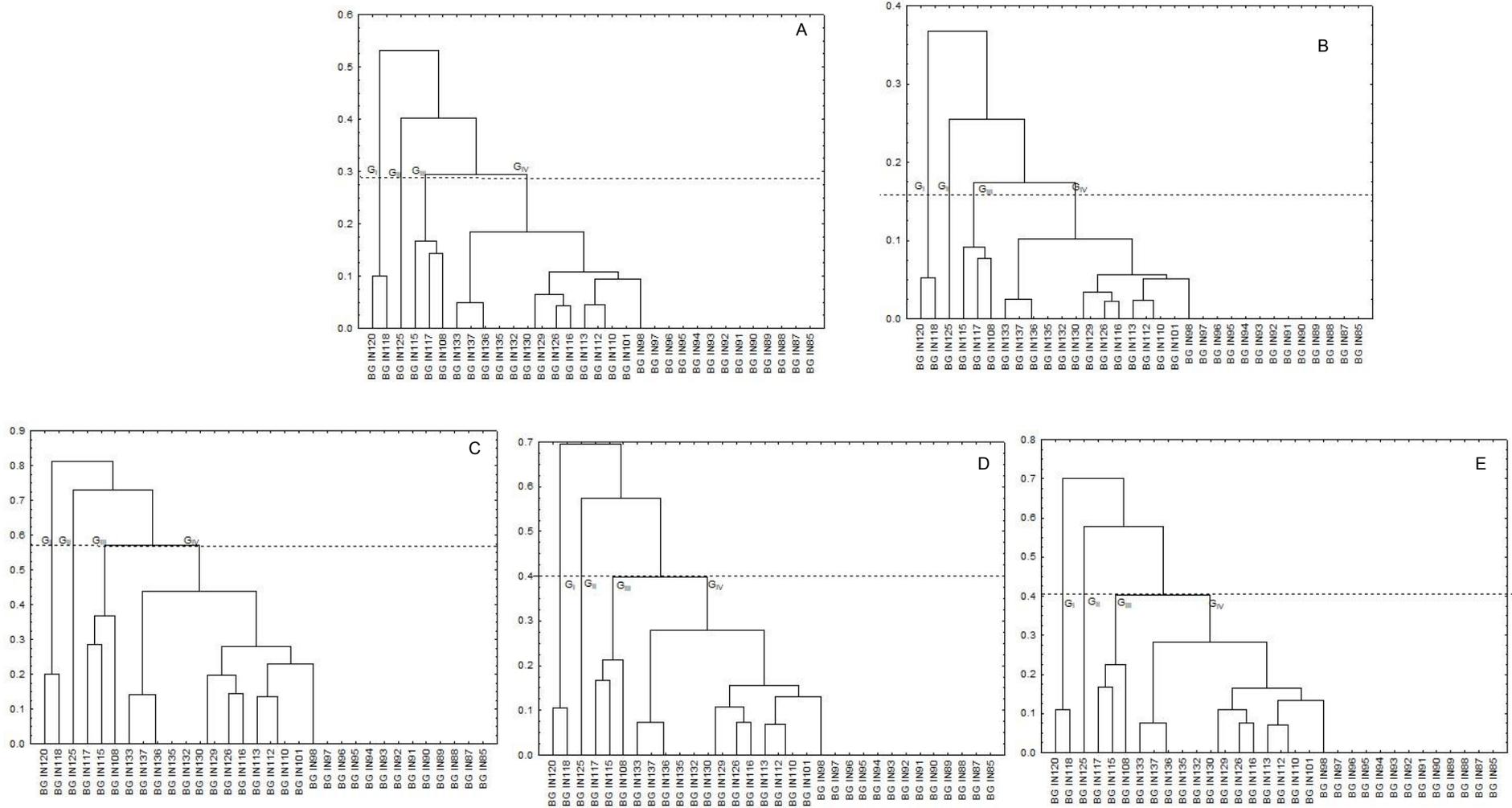


Figura 4: Dissimilaridade Genética entre 32 genótipos de inhame, com base em marcadores moleculares ISSR, com o uso dos Coeficientes de Coincidência Simples (A), Sokal & Sneath (B), Jaccard (C), Ochiai (D) e Nei e Li (E)

O coeficiente de correlação cofenético (CCC) obtido entre a matriz de agrupamento e a matriz de distância cofenética (C) a partir dos índices de Jaccard, Nei e Li, Ochiai e Sokal e Sneath, foram de elevada magnitude ( $r \geq 0,90$ ), evidenciando consistência dos agrupamentos. Já o CCC alcançado pela matriz de agrupamento e a matriz de distância do coeficiente de coincidência simples foi de magnitude inferior, com um valor de  $r = 0,14$  (Tabela 9). Esses resultados revelam a maior consistência dos agrupamentos formados com base no coeficiente de Jaccard, com  $r = 0,95$ , reforçando a adequabilidade do uso desse coeficiente em dados binários. Por sua vez, os demais índices com valores  $r \geq 0,90$  alcançaram uma excelente adequação entre os dendrogramas e suas matrizes originais.

Tabela 9: Índices de correlação cofenético e número de grupos formados em função dos coeficientes de similaridade provenientes da análise em 32 genótipos de inhame

| <b>Coeficientes</b>  | <b>Numero de Grupos</b> | <b>Coeficiente de Correlação Cofenético (r)</b> |
|----------------------|-------------------------|---|
| Jaccard              | IV                      | 0,95  |
| Ochiai               | IV                      | 0,93  |
| Sokal & Sneath       | IV                      | 0,93  |
| Nei & Li             | IV                      | 0,93  |
| Coincidência Simples | IV                      | 0,14  |

O PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos, podendo variar de 0 a 1, em que 1 seria a mais alta qualidade. Nesse estudo, os valores de PIC variaram de 0,06 – 0,21 (Tabela 10). Pode-se inferir, portanto, que o iniciador que obteve o maior valor de PIC, entre os demais, foi o Dpr3D06 com  $PIC = 0,21$ , no entanto, considerado pouco informativo para os genótipos em estudo de acordo com a classificação de Botstein et al. (1980).

Entretanto, no caso do inhame no presente estudo, esse valor é justificado, uma vez que os fragmentos foram computados como dados binários. Os tamanhos dos fragmentos dos pb (pares de bases) não foram utilizados para os marcadores SSR, devido a presença de genótipos com diferentes ploidias (triploides e tetraploides), levando à perda de informação por loco e consequentemente diminuindo os valores dos PICs. O mesmo resultado é discutido no trabalho com bananeira *Musa spp.*, em que Creste et al. (2003),

utilizando marcadores SSR atribuiu aos fragmentos amplificados, presença ou ausência de alelos em decorrência do caráter poliploide da espécie, observando portanto, uma diminuição dos valores do PIC.

Obidiegwu et al. (2009), estudando acessos de *D. alata*, empregaram 13 marcadores microssatélites e encontraram o valor médio do PIC igual a 0,65, mostrando existência de variabilidade entre os acessos, e os iniciadores revelaram-se eficazes para caracterizar estudos de germoplasma desta espécie.

Siqueira et al. (2011), avaliando a dissimilaridade genética entre genótipos de *D. alata* e espécies afins, utilizaram marcadores SSR. O conteúdo de informação de polimorfismo foi calculado em valores que variaram de 0,39 - 0,78, com uma média de 0,65. O valor mais elevado foi encontrado para PIC do loco H12 (PIC = 0,78), o qual conteve o maior número de alelos. Assim, como os autores anteriores, Tostain et al. (2006) aferiram a diversidade genética de 146 acessos de *D. rotundata* Poir com 10 iniciadores SSR, detectaram um valor de PIC de 0,51, revelando um alto polimorfismo dos marcadores. Portanto, ambos os estudos concluíram que o desenvolvimento de marcadores moleculares SSR é essencial para estudos da espécie, sendo de grande importância para a conservação e detecção da variabilidade genética em *Dioscorea spp.*

Tabela 10: *Primers* SSR, nome do *primer*, número de marcas, conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

| <b>Nº do <i>primer</i></b> | <b>Nome do <i>primer</i></b> | <b>Nº de marcas</b> | <b>PIC</b> |
|----------------------------|------------------------------|---------------------|------------|
| SSR 1                      | Da1F08                       | 4                   | 0,17       |
| SSR 3                      | Dab2D08                      | 4                   | 0,18       |
| SSR 5                      | Dpr3B12                      | 5                   | 0,15       |
| SSR 6                      | Dpr3D06                      | 2                   | 0,21       |
| SSR 7                      | Drp3F12                      | 2                   | 0,12       |
| SSR 9                      | Da1A01                       | 2                   | 0,06       |
| SSR 11                     | YM13                         | 4                   | 0,10       |
| Total                      |                              | 23                  | -          |
| Média                      |                              | 3,29                |            |

## CONCLUSÕES

- Os marcadores moleculares são adequados na caracterização dos acessos de inhame, para detectar a diversidade genética existente no germoplasma.
- A identificação de grupos dissimilares variou em função do marcador utilizado, porém o poder de discriminação do marcador SSR foi mais consistente quando comparado ao marcador ISSR.
- Os coeficientes de Jaccard, Nei e Li e Ochiai mostram resultados mais consistentes do que os coeficientes de Coincidência Simples e Sokal e Sneath, por apresentarem como prioridade comum à desconsideração das ausências conjuntas de bandas.
- Tanto os marcadores codominantes quanto os dominantes foram capazes de diferenciar os acessos e possibilitaram a identificação dos mais contrastantes para o uso em programas de melhoramento genético da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAEI, M, DARVISHZADEH, R e HASSANI, A. Molecular characterisation and similarity relationships among Iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 312-320, 2012.

AZEVEDO, A. L, COSTA, P. P, MACHADO, M. A, DE PAULA, C. M, SOBRINHO, F. S. High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers. **Genet Mol Res.**, v,n. p. 17;10(4):3530-8. 2011.

AZEVEDO, V.C. R. Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Molecular; **Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF, p.17, 2010.

BARONI, R.M. Mapeamento de locos de resistência à antracnose em feijoeiro. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia). Instituto Agronômico – IAC, Campinas, 79p, 2010.

BENITEZ, L. C.; RODRIGUES, I. C. S.; ARGE, L. W. P.; RIBEIRO, M. V.; BRAGA, E. J. B. Multivariate analysis of genetic divergence of genotypes of rice under salt stress during the vegetative phase. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 409-416, 2011.

BLAIR, M.W.; CHAVES, A.; TOFIÑO, A.; CALDERÓN, J.F.; PALACIO, J.D. Extensive Diversity and inter-genepool introgression in a world-wide collection of indeterminate snap bean accessions. **Theoretical and Applied Genetics**, v.120, p.1381-1391, 2010.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M. and DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* v.32, pp.314–331. 1980.

BUSSAB, W., MIAZAKI, E. S. e ANDRADE, D.F. Introdução à Análises de Agrupamentos. 1990.

CAMPOS, T.; OBLESSUC, P.R.; SFORÇA, D.A.; CARDOSO, J.M.K.; BARONI, R.M.; SOUSA, A.C.B.; CARBONELL, S.A.M.; CHIORATTO, A.F.; RUBIANO, L.L.B.; SOUZA, A.P. Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v.27, p.549-560, 2011.

CASTRO, A. P.; FRAXE, T. J. P.; PEREIRA, H. S.; KINUPP, V. F. Etnobotânica das variedades locais do cará (*Dioscorea* spp.) cultivados em comunidades no município de Caapiranga, estado do Amazonas. **Acta Botanica Brasilica**. v. 26, p. 658-667, 2012.

CARVALHO, S.I.C. de et al. Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 49p. 2003.

CHARTERS. Y.M.; WILKINSON, M.J. The use of self-pollinated progenies as “in-groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.160-166, 2000.

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; BENCHIMOL, L.L.; CHIAVEGATO, M.B.; DIAS, L.A.S; COLOMBO, C.A. Genetic diversity in common bean accessions evaluated by means of morpho-agronomical and RAPD data. **Scientia Agricola**, v.64, n.3, p.256-262, 2007.

CRESTE, S.; TULMAN NETO, A.; SILVA, S. O. FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**. v. 132, p. 259–268, 2003

CRUZ, C. D. Programa Genes: versão Windows; **Aplicativo computacional em genetic e estatística**. Viçosa-UFV, 648p. 2006.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Divergência genética**. In: CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. (Ed.). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, v. 1, p. 377 – 413. 2004.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, G. C. T. Divergência genética multivariada na preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.). **Agrotropica**, v. 9, p. 29 - 40, 1997.

DING, G. ZHANG, D. YU, Y. ZHAO, L • ZHANG, B. Population genetic diversity and divergence of the halobiotic herb *Limonium sinense* estimated by AFLP and ISSR, and implications for conservation. **Plant Syst Evol** . v.299, p.131–138. 2013.

EGESI, C. N.; ASIEDU R.; UDE, G .;. OGUNYEMI, S.; EGUNJOBI J. K. AFLP marker diversity in water yam (*Dioscorea alata* L.). **Plant Genetic Resources**. v.4, p.181–187, 2006.

ENDER, M.; TERPSTRA, K.; KELLY, J.D. Marker assisted selection for white mold resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v.2, p.149-157, 2008.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M.; MOURA, M.C. de O.; BOTREL, M.C. G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D.. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) Macleish). **Scientia Forestalis**, v. 70, p. 97-106, 2006.

EVERITT, B. S. **Cluster Analysis**. London: Edward Arnold. 1993.

FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; SILVEIRA, J.S.M.; FERRÃO, M.A.G.; BRAGANÇA, S.M. EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. **Rev. Ceres** v. 273: p. 555-560, 2011.

GUPTA, M.; CHYI, Y.-S.; ROMERO-seVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolution a rily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.998-1006, 1994.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M.R. ISSR variationsin eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**, v.117, p.186-190, 2008.

KWAK, M.; GEPTS, P. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris*, L., Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v.118, p.979-992, 2009.

LITT, M.; LUTY, L.A. A hypervariable microsatellite revealed byin vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.44, n.3, p.398-401, 1989.

LIU, K. and MUSE, S.V. (2005) POWERMARKER: Integrated analysis environment for genetic marker data –**Bioinformatics** 21 (9): 2128-2129 (2005).

MARTINS, A. Variabilidade genética intravarietal das castas. In Atlas das castas da Península Ibérica. **Böhm J.** (eds)., p. 159-163. 2011.

MATTHEWS, D.; MCNICOLL, J.; HARDING, K.; MILLAM, S. 5'-anchored simple-sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. **Plant Cell Reports**, v.19, p.210-212, 1999.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de são Paulo, 2002.

MEYER, A.das, GARCIA, A. A. F., SOUZA, A. P. de, SOUZA JÚNIOR, C. L.de. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant

markers in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, 27(1):83-91, 2004.

MELO FILHO, P.A.; SATOS, R.C.; MAFRA, R.C.; SANTOS, J.W. Classificação de germoplasma de *Dioscorea* sp. através da análise das componentes principais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.619-623, 2000.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregante analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA. v.88, p.9828-9832. 1991.

MINGOTI, S.A., Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada, **Editora UFMG**, Belo Horizonte, 295p. 2005.

MOHAMMADI, S. A. AND PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* 43: 1235-1248. 2003.

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

NAYAK, S. A. KUMAR, S. SATAPATHY, K. MOHARANA, A. BEHERA, B. BARIK, D. P. ACHARYA, L. In vitro plant regeneration from cotyledonary nodes of *Withania somnifera* (L.) Dunal and assessment of clonal fidelity using RAPD and ISSR markers. **Acta Physiol Plant**. v.35. Pp.195–203. 2013.

NEGRI, V; TIRANTI, B. Effectiveness of in situ and ex situ conservation of crop diversity. What a *Phaseolus vulgaris* L. landrace case study can tell us. **Genetica**, v.138, p.985-998, 2010.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.76, n.10, p.5269-5273, 1979.

NUCCI, S.M. **Diversidade Genética em germoplasma de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) identificada por marcadores SSR e ISSR**. 2011. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2011.

OBIDIEGWU, J. E. ASIEDU, R. ENE-OBONG, E. E. MUONEKE, C.O. and KOLESNIKOVA-ALLEN, M. Genetic characterization of some water yam (*Dioscorea alata* L.) accessions in West Africa with simple sequence repeats. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, vol.7, v.3 e 4, p.634 – 638, 2009.

OLIVEIRA, A. P.; SILVA, D.F.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, A. N. P.; SANTOS, R. R.; SILVA, N. V.; OLIVEIRA, F. J. M. Tecnologia alternativa para produção de túberas-semente de inhame e seus reflexos na produtividade. **Horticultura Brasileira** v.30, p.553-556, 2012.

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

PATHAK, H. and DHAWAN, V. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant**. v.48, p.137–143, 2012.

PERSEGUINI, J.M.K.C.; CHIORATO, A.F.; ZUCCHI, M.I.; COLOMBO, C.A.; CARBONELL, S.A.M.; MONDEGO, J.M.C.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A.A.F.; CAMPOS, T.; SOUZA, A.P.; RUBIANO, L.B. Genetic diversity in cultivated carioca common bean based on molecular marker analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.1, p.88-102, 2011.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J., FILHO, W. S. S., RITZINGER, R., AMORIM, E. P., COSTA, M. A. C., MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v.33, n.3, p.868-876, 2011.

SANTOS, D.; HAESBAERT, F. M.; LÚCIO, A. D.; LOPES, S. J.; FILHO, A. C.; BENZI, V. Randomness and variability productive of bean pod. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.7, p.1147-1154, 2012.

SARTIE, A. ASIEDU, R. FRANCO, J. Genetic and phenotypic diversity in a germplasm working collection of cultivated tropical yams (*Dioscorea* spp). **Genet Resour Crop Evol** . v. 59, p.1753–1765. 2012.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, S.N.V.; HAMILTON, S.; SINHORATI, D.; SILVA, R.B.; OLIVEIRA, M.A.R. Fluxo gênico em soja na região oeste do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.515-520, 2007.

SHARMA, K. MISHRA, A. K. AND MISRA, R. S. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. **African Journal of Biotechnology** Vol. 7 (8), pp. 1018-1022, 2008.

SILVA, M.L.; QUEIROZ, M.A.; FERRERIA, M.A.J.F.; BENKO-ISEPPOM, A.M. Caracterização molecular por ISSR de acessos de melancia do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas. **Horticultura Brasileira** v.30, pp. 4445-S4451, 2012.

SIQUEIRA, M. V. B. MARCONI, T. G. BONATELLI, M. L. ZUCCHI, M, I. VEASEY, E. A. New microsatellite loci for water yam (*dioscorea alata*, dioscoreaceae) and cross-amplification for other dioscorea species. **American Journal of Botany**. pp. 144–146. 2011.

SOUSA, A.C.B.; JUNGSMANN, L.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D.A.; BOAVENTURA, L.R.; SILVA, G.M.B.; ZUCCHI, M.I.; JANK, L.; SOUZA, A.P. Development of

microsatellite markers in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) and their transferability to other tropical forage grass species. **Plant Breeding**, p.104-111, 2011.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows (data analysis software system)**, version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA), 2005.

TARTARINI, S. RAPD markers linked to the Vf gene for scab resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetic**. v. 92, p. 803-810. 1996.

THUL, S. T. DAROKAR, M. P. SHASANY, A. K. KHANUJA, S.P.S. Molecular Profiling for Genetic Variability in Capsicum Species Based on ISSR and RAPD Markers. **Springer Science**. v. 51, p.137–147, 2012.

TOSTAIN, S. AGBANGLA, C. SCARCELLI, N. Mariac, C. DAI'NOU, O. BERTHAUD, J. and PHAM, J-L. Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir.) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v.5, n.2, p.71–81, 2006.

VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v.137, n.1, p.63-72, 2004.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. de F.; SILVA, M. S.; FALEIRO, F. G. **Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do cerrado acessada por meio de descritores morfológicos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 15p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 129).

WILLIAMS, J. K. G.; KUBELI, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v.18, p.6531-6535. 1990.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Boston: Kluwer, p.43-86, 1998.

ZHOU, Y., ZHOU, C., YAO, H., LIU, A., TU, R. Application of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Th cultivars). **Life Science Journal**, Vol 5, N° 4, 2008.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização molecular permite a discriminação de acessos e a prospecção da variabilidade entre acessos de uma mesma espécie. Os marcadores moleculares vêm sendo uma excelente alternativa para detecção da variabilidade genética, pois apresentam ampla capacidade de amostragem do genoma. Acrescenta-se que, os marcadores codominantes apresentaram uma elevada capacidade discriminatória de acessos em comparação aos dominantes e possibilitaram a identificação dos acessos mais contrastantes para uso no programa de melhoramento genético em *Dioscorea spp.*

Os coeficientes de Jaccard, Nei e Li e Ochiai mostraram resultados mais consistentes. Isso foi atribuído ao fato deles apresentarem como prioridade comum a desconsideração das ausências conjuntas de bandas. Portanto, em função das ausências conjuntas de bandas não significarem necessariamente que as regiões do DNA são idênticas, sugere-se o emprego desses coeficientes em análises de dissimilaridade genética quando empregados os marcadores moleculares.

O coeficiente de Shannon-Weaver permitiu aferir os descritores que mais contribuíram para analisar a variabilidade fenotípica existente no banco de germoplasma de inhame.

As informações obtidas com a estimativa da diversidade genética (marcadores moleculares e morfológicos) revelaram a variabilidade entre os acessos de inhame avaliados, portanto, ambos os marcadores foram adequados para o estudo da diversidade genética de *Dioscorea spp.* Porém, não há uma concordância entre esses marcadores. Contudo, as informações desse trabalho servirão de base para uso no programa de melhoramento de inhame da UFRB. Entretanto, devido a falta de informações genéticas a respeito da cultura do inhame em geral, torna-se necessário, para um melhor entendimento da variabilidade genética dessas espécies e melhor esclarecimento sobre a relação desses grupos taxonômicos, mais estudos de diversidade, com um número maior de marcadores de DNA.

**ANEXO I**

**PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE TÚBERAS TROPICAIS (MINI-PREP) - Extração de DNA inhame (Kamal Sharma et al. 2009)**

**Solução tampão de extração**

| Soluções reagentes [ ] Final |       | V; Final 100 mL |
|------------------------------|-------|-----------------|
| CTAB 10%                     | 2,0 % | 20,0 mL         |
| NaCl 5 M                     | 2,0 M | 40,0 mL         |
| Tris HCl 1M pH 8,0           | 0,1 M | 10,0 mL         |
| EDTA 0,5 M                   | 0,02M | 4,0 mL          |
| 2-mercaptoetanol             | 2,0 % | 2,0mL           |
| PVP (Polivinilpirrolidona)   | 2,0 % | 2,0 g           |
| H2O de milli-Q q;s;p;        |       | 100,0 mL        |

\* adicionar na hora da extração de DNA (20 µL de 2-mercaptoetanol/1mL de tampão).

OBS.: Todas as soluções devem ser preparadas na hora da extração

**Procedimento**

1. Coletar as folhas das plantas, de preferência jovens e saudáveis, evitando-se áreas atacadas por pragas e doenças; No ato da coleta envolver as amostras em recipiente que as protejam da luz para evitar a fotossíntese e a produção de metabólitos secundários; Elas deverão permanecer no escuro de 12 a 18 horas até a hora da extração de DNA;

**Extração de DNA:**

2. Pesar 300 mg do tecido vegetal, usar almofariz na presença de nitrogênio líquido, macerar o tecido usando micro-pistilo;
3. Adicionar 1,0 mL da solução tampão de extração previamente aquecida (65°C); Macerar novamente na presença do tampão na capela e esperar a mistura adquirir a forma líquida;

4. Transferir a mistura líquida com auxílio de uma espátula, para microtubos devidamente identificados (eppendorf 2,0 mL); Adicionar 5,0  $\mu\text{L}$  de proteinase K ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ );
5. Colocar as amostras na estufa  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos, homogeneizar a cada 10 minutos;
6. Retirar da estufa e incubar os microtubos em banho-maria a  $65^\circ\text{C}/30$  minutos, homogeneizar a cada 10 minutos;
7. Centrifugar 8.000 g (9.000rpm)/10min;
8. Retirar o sobrenadante e transferir para novos tubos (eppendorf 2,0mL);
9. Adicionar igual volume coletado à solução [fenol: clorofórmio: álcool-Isoamílico (25: 24: 1)], e misturar cuidadosamente (30 a 40)X;
10. Centrifugar 8.000 g (9.000 rpm)/10min;
11. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos devidamente identificados (eppendorf 2,0 mL);
12. Adicionar ao sobrenadante 200  $\mu\text{L}$  tampão (NaCl 2,0M + PEG 4%) misturar por inversão;
13. Incubar as amostras durante 15 min;  $4^\circ\text{C}$ ;
14. Centrifugar 9.000g (8.680 rpm)/10min;
15. Retirar o sobrenadante e transferir para novos tubos (eppendorf 1,5 mL)
16. Adicionar álcool Isopropílico (gelado), equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado;
17. Pescar o DNA com auxílio de uma ponteira e transferir para novos tubos (eppendorf 1,5 mL);
18. Lavar o pellet duas vezes com o tampão de lavagem [Acetato de amônio 15 mM + Etanol 75% + TE(Tris-HCl 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM pH 8,0)];
19. Secar o pellet em temperatura ambiente (para remoção do etanol);
20. Re suspender o pellet (50-70)  $\mu\text{L}$  de tampão [TE + RNase ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ )];
21. Incubar na estufa  $37^\circ\text{C}$  durante 60 minutos;
22. Conservar a solução estoque a  $-20^\circ\text{C}$ .

Os tubos e ponteiras contaminados com fenol clorofórmio devem ser descartados em recipiente apropriado.

**ANEXO II**





## **ANEXO III**





