

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO CARLOS ALBERTO REYES
MALDONADO – UNEMAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS – PGMP

GISEUDO APARECIDO DE PAIVA

**Caracterização molecular de variedades locais de mandioca cultivadas e
manejadas por produtores de farinha Uarini da região de Tefé, Amazonas Brasil**

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
ABRIL - 2023

GISEUDO APARECIDO DE PAIVA

Caracterização molecular de variedades locais de mandioca cultivadas por produtores de farinha Uarini da região de Tefé, Amazonas Brasil

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO CARLOS ALBERTO REYES MALDONADO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi

Coorientadoras: Dra. Juliana Rodrigues Larrosa Oler
Dra. Auana Vicente Tiago

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
ABRIL - 2023

**Caracterização molecular de variedades locais de mandioca cultivadas e
manejadas por produtores de farinha Uarini da região de Tefé, Amazonas
Brasil**

GISEUDO APARECIDO DE PAIVA

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
“Carlos Alberto Reyes Maldonado”, como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Comissão Examinadora:

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ANA APARECIDA BANDINI ROSSI
Data: 05/04/2023 21:50:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Presidente: Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi
(Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT)**

Documento assinado digitalmente
 JULIANA RODRIGUES LARROSA OLER
Data: 10/04/2023 09:09:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Titular 1: Profa. Dra. Juliana Rodrigues Larrosa Oler
(Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - IDS, Tefé/AM)**

Documento assinado digitalmente
 AUANA VICENTE TIAGO
Data: 10/04/2023 11:00:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Titular 2: Profa. Dra. Auana Vicente Tiago
(Embrapa Agrossilvipastoril – Sinop/MT)**

Documento assinado digitalmente
 SERGIO ALESSANDRO MACHADO SOUZA
Data: 18/04/2023 14:27:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Titular 3: Prof. Dr. Sergio Alessandro Machado Souza
(Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT)**

Documento assinado digitalmente
 JULLIANE DUTRA MEDEIROS
Data: 07/04/2023 16:00:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Titular 4: Profa. Dra. Julliane Dutra Medeiros
(Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF)**

P142c	PAIVA, Giseudo Aparecido de. Caracterização Molecular de Variedades Locais de Mandioca Cultivadas e Manejadas por Produtores de Farinha Uarini da Região de Tefé, Amazonas Brasil / Giseudo Aparecido de Paiva - Alta Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2023. 63 f.; 30 cm. (ilustrações) Il. color. (sim) Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação/Mestrado) - Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2023. Orientador: Ana Aparecida Bandini Rossi Coorientador: Juliana Rodrigues Larrosa Oler; Auana Vicente Tiago 1. Manihot Esculenta. 2. Microssatélites. 3. Issr. 4. Farinha Uarini. I. Giseudo Aparecido de Paiva. II. Caracterização Molecular de Variedades Locais de Mandioca Cultivadas e Manejadas por Produtores de Farinha Uarini da Região de Tefé, Amazonas Brasil: . CDU 633.493(811.3)
-------	--

AGRADECIMENTOS

Á Deus pelo dom da vida.

Á Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, por proporcionar a realização desta pós-graduação fornecendo todo plantel de excelentes profissionais que contribuíram para minha formação.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e a todos professores e profissionais que contribuíram para minha formação.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudo.

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelo financiamento do projeto “Interdisciplinaridade para o fortalecimento da cadeia produtiva da farinha Uarini - Etnobotânica e diversidade genética de *Manihot esculenta* Crantz.” EDITAL N. 003/2020 – PAINTER, coordenado pela pesquisadora Dra. Juliana Rodrigues Larrosa Oler e executado pelo Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Á minha família e amigos, que sempre me apoiaram e incentivaram nessa jornada, em especial aos meus pais (João Aparecido de Paiva e Nair Lúcia de Pádua de Paiva) e meus irmãos (Gisleu Aparecido de Paiva, Gildo Alcides de Paiva e Gislaine Luciana de Paiva) que sempre com ânimo e entusiasmo foram e são meus alicerces.

Á minha esposa Laiza Almeida Dutra, pela compreensão, amor, carinho, dedicação e apoio incondicional.

Aos meus sogros (Jan Severino Dutra e Luciene Auxiliadora de Almeida Dutra) pelo apoio e incentivo.

Á minha orientadora, Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi por todos os ensinamentos, dedicação e carinho.

As minhas co-orientadoras Dra. Juliana Rodrigues Larrosa Oler, coordenadora e responsável pelo desenvolvimento de todo este projeto, e Dra. Auana Vicente Tiago pela atenção, apoio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A pesquisadora Dra. Eliane Cristina Moreno de Pedri, pelo apoio e orientação no desenvolvimento da pesquisa.

Á toda equipe do Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da UNEMAT Alta Floresta, MT, por todos os ensinamentos, apoio, incentivo, coleguismo e parcerias no desenvolvimento de pesquisas científicas.

Á minha grande amiga Ana Paula Roveda pela parceria de sempre.

Á pesquisadora Renata de Barros Ramos Oliveira, responsável técnica pela Plataforma de Sequenciamento de DNA Sanger RPT01E / P01-003, Instituto René Rachou - Fiocruz Minas, pela paciência, compreensão, atenção e auxílio no desenvolvimento da genotipagem.

Meu muito obrigado a todos e a cada um!!!

BIOGRAFIA

Giseudo Aparecido de Paiva, filho de João Aparecido de Paiva e Nair Lúcia de Pádua de Paiva. Nascido em 14 de outubro de 1995, na cidade de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. Casado com Laiza Almeida Dutra. Em 2013 concluiu o ensino médio pela Escola Estadual Vitória Furlani da Riva, no município de Alta Floresta, Mato Grosso. Em 2015 ingressou no ensino superior no curso de Licenciatura Plena e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, norte de Mato Grosso, concluindo em 2021. Neste mesmo ano iniciou o curso de Pós-graduação stricto sensu no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela UNEMAT – Campus de Alta Floresta, obtendo o título de Mestre em abril de 2023, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi, e coorientação da Dra. Juliana Rodrigues Larrosa Oler e Dra. Auana Vicente Tiago.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	4
2.2. Cadeia Produtiva da Farinha Uarini	6
2.3. Utilização e importância econômica	5
2.4. Recursos genéticos e conservação.....	8
2. 5. Marcadores moleculares.....	10
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
4.1 CAPÍTULO I	18
Diversidade genética de variedades locais de mandioca envolvidas na cadeia produtiva da farinha Uarini por meio de marcadores moleculares SSR	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1. Área de estudo e amostragem.....	21
2.2. Extração do DNA	24
2.3. Caracterização molecular e amplificação via PCR	26
2.4. Análise dos dados	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4. CONCLUSÕES.....	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

4.2 CAPÍTULO II.....	44
Diversidade genética de variedades locais de mandioca da cadeia produtiva de farinha Uarini por meio de marcadores moleculares ISSR	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1. Área de estudo e amostragem.....	47
2.2. Extração do DNA	48
2.3. Caracterização molecular e amplificação via PCR	49
2.4. Análise dos dados	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4. CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Tabela 1. Número e código atribuídos a cada variedade local coletada nos respectivos municípios.....	23
Tabela 2. Primers microssatélites marcados com fluorocromos (FAM, VIC e NED) e a amplitude alélica utilizados neste estudo	27
Tabela 3. Análise descritiva por primer microssatélite para 48 indivíduos de <i>Manihot esculenta</i> . Número de alelos (N_a); Heterozigosidade esperada (H_e); Heterozigosidade observada (H_o); Índice de fixação (F); Conteúdo de informação polimórfica (PIC)	30
Tabela 4. Diversidade genética por população de <i>Manihot esculenta</i> . Número de variedades locais amostradas (N) Número de alelos (N_a); Heterozigosidade esperada (H_e); Heterozigosidade observada (H_o); Índice de fixação (f); Conteúdo de informação polimórfica (PIC).....	33
Tabela 5. Análise molecular de variância (AMOVA) das 48 variedades locais de mandioca cultivadas pelos produtores da cadeia produtiva de farinha Uarini. Grau de Liberdade (GL); Soma dos Quadrados (SQ); Componente de Variância (CV), Variância Total (VT), Diferenciação genética das populações (F_{ST}) e Probabilidades de significância (P).....	34
CAPÍTULO II: Tabela 1. Número e código atribuídos a coleta de cada variedade local de mandioca coletada nos respectivos municípios	47
Tabela 2. Número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP), porcentagem de polimorfismo (%P) e índice de conteúdo polimórfico (PIC) para os sete primers ISSR em relação as 41 variedades locais de mandioca coletadas na Indicação Geográfica Uarini, estado do Amazonas, Brasil	52
Tabela 3. Análise molecular de variância (AMOVA) das 41 variedades locais de mandioca cultivadas pelos produtores da cadeia produtiva de farinha Uarini. Grau de Liberdade (GL); Soma dos Quadrados (SQ); Componente de Variância (CV), Variância Total (VT), Índice de fixação entre populações (F_{ST}) e Probabilidades de significância (P).....	54

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO: Figura 1. Manihot esculenta: Indivíduo adulto (A); Folha (B); Caule (C); Raízes (D). Fonte: Eliane C. M. Pedri 2022.	4
CAPÍTULO I: Figura 1. Mapa de localização dos municípios amostrados no estado do Amazonas.	21
Figura 2. Extração de DNA total de tecido foliar de Manihot esculenta. Quebra mecânica do tecido foliar com nitrogênio líquido (A, B e C); pó resultante da quebra mecânica (D); processo de extração sendo realizado na capela de exaustão (E); processo de centrifugação (F); separação da fase aquosa (sobrenadante) dos constituintes celulares após inserção do tampão e centrifugação (G); separação das fases após lavagem seguida de centrifugação (H); Pellet (I).....	25
Figura 3. Quantificação do DNA total de sete indivíduos (em duplicata) de Manihot esculenta da população de Maraã, por meio de eletroforese utilizando gel de agarose 1%. Marcador de DNA λ de 100 ng/ μ L (M).....	26
Figura 4. Resultado da amplificação via PCR, utilizando o primer microsatélite GA140, submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, com amostras de 48 indivíduos de variedades locais de Manihot esculenta, divididos em quatro populações. (Uarini, U01-U13); (Alvarães, A01-A19); (Maraã, 01-07); e (Tefé, T01-T09).	27
Figura 5. Picos de fluorescência encontrados na genotipagem dos indivíduos de Manihot esculenta e detecção do tamanho dos fragmentos amplificados. Primer GA12 marcado com a fluorescência FAM (azul), heterozigoto (A); primer GA21 marcado com a fluorescência FAM (azul), homozigoto (B).....	28
Figura 6. Representação das frequências alélicas dos 12 primers microsatélites utilizados para a caracterização molecular dos 48 indivíduos de Manihot esculenta. ..	32
Figura 7. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (1983), em quatro populações de Manihot. esculenta.	33
Figura 8. Agrupamento dos 48 indivíduos de Manihot esculenta obtido por meio do método UPGMA, com base na distância genética de Nei (1983). Uarini 01-13 (vermelho); Alvarães 01-19 (verde); Maraã 01-07 (azul); Tefé 01-09 (amarelo).....	35
Figura 9. Análise bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE. Valores de ΔK evidenciando o melhor K com um pico maior em $k=3$ (A); Representação dos 48 indivíduos de quatro populações de Manihot esculenta com base em 12 primers microsatélites. Uarini (U01-U13), Alvarães (A01-A19), Maraã (M01-M07) e Tefé (T01-109) (B).	36
Figura 10. Análise das coordenadas principais dos 48 indivíduos de Manihot esculenta provenientes dos municípios de Uarini, Alvarães, Maraã e Tefé.....	38
CAPÍTULO II: Figura 1. Produtos de amplificação do DNA genômico de 13 variedades locais (população de Uarini 1-13) de mandioca com o primer UBC 807. M: marcador 100 pb. Linhas vermelhas indica os fragmentos polimórficos. Linhas amarelas indica fragmentos monomórficos.....	53

Figura 2. Estimativas das correlações entre as similaridades genéticas para números crescentes de primers ISSR polimórficos (A) e valores de estresse, que indicam o número mínimo ideal de fragmentos (45 fragmentos) para as análises genéticas das 41 variedades locais de mandioca (B).	55
Figura 3. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento Ligação Média Entre Grupo (UPGMA) e complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, em 41 variedades locais de mandioca com base em sete marcadores moleculares ISSR.	56
Figura 4. Análise bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE. Valores de ΔK evidenciando o melhor K com um pico maior em $k=2$	57
Figura 5. Agrupamento das 41 variedades locais de mandioca por meio do software STRUCTURE, em dois grupos genéticos (vermelho e verde). As linhas verticais ao longo do eixo X representam os indivíduos e os segmentos coloridos ao longo do eixo Y demonstram o coeficiente de associação de cada indivíduo atribuído a cada um dos K. Os números inferidos entre parênteses correspondem às populações: (1: Uarini; 2: Alvarães; 3: Maraã; 4: Tefé).....	57

RESUMO

PAIVA, Giseudo Aparecido de; M. Sc. UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO CARLOS ALBERTO REYES MALDONADO – UNEMAT, abril de 2023. **Caracterização molecular de variedades locais de mandioca cultivadas por produtores de farinha Uarini da região de Tefé, Amazonas Brasil.** Orientadora: Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi; Coorientadoras: Dra. Juliana Rodrigues Larrosa Oler; Dra. Auana Vicente Tiago.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é produzida em todo Brasil por possuir fácil adaptação a diferentes climas e solos, representando papel importante na segurança alimentar e na geração de emprego e renda. Esta pesquisa faz parte do projeto Interdisciplinaridade para o fortalecimento da cadeia produtiva da farinha Uarini - Etnobotânica e diversidade genética de *Manihot esculenta* Crantz, e tem por objetivo realizar a caracterização molecular de variedades locais de mandioca cultivadas por produtores de farinha Uarini da região de Tefé, Amazonas, Brasil. A amostragem foi realizada na área de Indicação Geográfica da Farinha Uarini, compreendendo os municípios Uarini, Alvarães, Tefé e Maraã, localizados no estado do Amazonas. Foi realizada a extração de DNA, seguindo o método CTAB, de 48 variedades locais de mandioca. Posteriormente foram realizadas as PCRs utilizando marcadores moleculares ISSR e SSR. Os produtos das PCRs de ISSR foram submetidos a eletroforese, e os resultados convertidos em uma matriz binária de presença e ausência de bandas, e as PCRs de SSR foram encaminhadas para FIOCRUZ para genotipagem. Os 12 *primers* SSR amplificaram um total de 78 alelos, com média de sete por *primer*. A maioria dos primers apresentaram heterozigosidade observada maior que a esperada. O PIC variou de 0,07 (SSRY43) a 0,83 (SSRY35), com média de 0,55. Foram encontrados 15 alelos raros e 30 alelos exclusivos. A AMOVA revelou maior variação genética dentro das populações do que entre as populações. O método UPGMA e a análise bayesiana formaram três grupos cada. Os sete primers ISSR amplificaram 82 fragmentos, sendo 51 polimórficos. A porcentagem média de polimorfismo foi de 62,20%. O PIC variou de 0,21 (UBC 834) a 0,60 (TRI GTG), com média de 0,32. O método de agrupamento UPGMA formou três grupos e a análise bayesiana dois. Há diversidade genética entre as variedades locais de mandioca estudadas, sendo maior dentro das populações do que entre as populações, resultado que pode ter sido favorecido pela atividade de trocas de manivas entre os produtores. Os métodos de agrupamentos utilizados não separaram as variedades locais por localidade de coleta. A divergência genética entre as variedades locais representa um fator importante para a preservação da espécie, além de um potencial a ser explorado em programas de conservação e reprodução em cultivos da espécie, ou até mesmo em programas de melhoramento, com destaque para a população de Alvarães que apresentou maior número de alelos raros e alelos exclusivos.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*; microssatélites; ISSR; farinha Uarini.

ABSTRACT

PAIVA, Giseudo Aparecido de; M. Sc. STATE UNIVERSITY OF MATO GROSSO
CARLOS ALBERTO REYES MALDONADO – UNEMAT, April 2023. **Molecular characterization of local cassava varieties cultivated by Uarini flour producers from the Tefé region, Amazonas, Brazil.** Advisor: Prof. Dr. Ana Aparecida Bandini Rossi; Co-advisors: Dr. Juliana Rodrigues Larrosa Oler; Dr. Auana Vicente Tiago.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is produced throughout Brazil due to its easy adaptation to different climates and soils, playing an important role in food security and generating employment and income. This research is part of the project “Interdisciplinarity for the Strengthening of the Uarini Flour Production Chain - Ethnobotany and Genetic Diversity of *Manihot esculenta* Crantz”, and aims to perform molecular characterization of local cassava varieties cultivated by Uarini flour producers from the Tefé region, Amazonas, Brazil. Sampling was carried out in the Uarini Flour Geographical Indication area, comprising the municipalities of Uarini, Alvarães, Tefé, and Maraã, located in the state of Amazonas. DNA extraction was performed using the CTAB method from 48 local cassava varieties. Subsequently, PCR was performed using ISSR and SSR molecular markers. The products of ISSR PCR were converted into a binary matrix of band presence and absence, and the SSR PCR products were sent to FIOCRUZ for genotyping. The 12 SSR *primers* amplified a total of 78 alleles, with an average of seven per *primer*. Most primers showed observed heterozygosity greater than expected. PIC ranged from 0.07 (SSRY43) to 0.83 (SSRY35), with an average of 0.55. Fifteen rare alleles and 30 exclusive alleles were found. AMOVA revealed greater genetic variation within populations than between populations. UPGMA method and Bayesian analysis formed three groups each. The seven ISSR *primers* amplified 82 fragments, with 51 being polymorphic. The average percentage of polymorphism was 62.20%. PIC ranged from 0.21 (UBC 834) to 0.60 (TRI GTG), with an average of 0.32. The UPGMA clustering method formed three groups and the Bayesian analysis formed two. There is genetic diversity among the local cassava varieties studied, with greater diversity within populations than between populations, a result that may have been favored by the activity of exchanging stem cuttings among producers. The clustering methods used did not separate the local varieties by collection location. Genetic divergence among the local varieties represents an important factor for the preservation of the species, as well as a potential to be explored in conservation and cultivation reproduction programs for the species, or even in breeding programs, with emphasis on the Alvarães population which showed a higher number of rare and exclusive alleles.

Keywords: *Manihot esculenta*; microsatellites; ISSR; Uarini flour.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euphorbiaceae Juss., e ao gênero *Manihot* Mill., apresenta forma de vida arbustiva, e se desenvolve em substrato terrícola (MARTINS et al., 2023). Essa espécie de mandioca que conhecemos hoje, é originária da América do Sul, com sua domesticação e cultivo atribuídos a diversas culturas que habitavam essa região há cerca de dez mil anos atrás (RIVAL; MCKEY, 2008; ISENDAHL, 2011). E isso, se tornou um grande exemplo da capacidade humana para controlar a reprodução de uma espécie natural em benefício próprio (MARTINS, 2005; ADAMS et al., 2008).

Muito difundida por todo Brasil, a mandioca representa papel importante na geração de emprego e renda, pois seu cultivo é vantajoso devido ao seu ótimo aproveitamento, sendo utilizadas desde as folhas e caules até as raízes para geração de alimento (EMBRAPA, 2003; BERNARDO et al., 2016; MACEDO, 2016). Além de sua importância alimentar e social na agricultura familiar, a mandioca também é fonte de matéria-prima para a agroindústria, sendo a parte aérea utilizada para obter produtos direcionados à alimentação animal, devido seu potencial proteico (GOEDERT, 2011; VIEIRA et. al., 2013; BERNARDO et al., 2016). Na região Amazônica, a mandioca é utilizada na culinária local (LOBO et al., 2018), e apresenta potencial uso dos resíduos (casca, entrecasca e pontas) para produção de bioetanol através da hidrólise ácida (LOUREIRO et al., 2020).

O estado do Amazonas possui diversas áreas ideais para produção, devido à baixa altitude, topografia plana que favorece a mecanização e precipitação pluviométrica com época bem definida (MARTINS et. al., 2019). É o segundo maior produtor de mandioca da região Norte, tendo boa parte da produção regionalmente beneficiada nas chamadas casas de farinha, caracterizadas pela produção artesanal. A farinha é o principal subproduto de consumo (cerca de 58 kg por pessoa/ano), assegurando a subsistência alimentar, cultural e econômica de muitas comunidades amazonenses (IDAM, 2019).

A mandioca possui grande variabilidade genética, devido a sua ampla distribuição por todo país (GALERA & VALLE, 2007). Essa variabilidade encontrada

é oriunda do trabalho realizado pelos agricultores familiares, que ao desenvolver atividades como troca de manivas entre si, vem atuando como mantenedores da diversidade local (MARTINS; OLIVEIRA, 2009). Esse trabalho é muito importante na conservação e manutenção da diversidade genética da espécie, uma vez que as variedades encontradas nas roças desses produtores podem constituir uma forma de recurso genético a ser conservado e utilizado em programas de melhoramento, pois podem apresentar genes de resistência e fácil adaptação (FARALDO et al., 2000; FUKUDA et al., 2005).

A variabilidade genética da mandioca também pode ser resultado da seleção natural, do processo de domesticação da espécie cultivada, da predisposição para polinização cruzada, dos altos níveis de heterozigosidade e da deiscência dos frutos que conseguem ser preservados em bancos de sementes e são capazes de germinar após o processo de derrubada e queimada para a instalação da nova lavoura (FUKUDA & SILVA, 2002). Neste sentido, a caracterização de espécies vegetais é uma importante forma de conhecer a diversidade genética existente, buscando auxiliar no uso dos recursos naturais, de modo que, possibilite a inclusão de novos materiais de interesse em programas de melhoramento genético, servindo como base para o desenvolvimento de estratégias de conservação (SOUZA, 2015).

Para a caracterização de espécies vegetais são utilizados diferentes métodos, como: morfológicos, agronômicos e moleculares (BORÉM & CAIXETA, 2016). As informações obtidas, são expressas em medidas de dissimilaridade, representando a diversidade no conjunto de populações e genótipos estudados (CRUZ et al., 2011). Devido a isso, o emprego de teoria e métodos da Genética de Populações, bem como de suas ferramentas, como por exemplo, os marcadores moleculares microssatélites e ISSR, mostram-se efetivos no mapeamento da diversidade genética manejada pelos agricultores tradicionais (CARRASCO et al., 2016).

Estes marcadores moleculares podem ser considerados ferramentas básicas para os estudos em genética da conservação, pois permitem a caracterização da variabilidade e estrutura genética nas populações, sendo que, esta estrutura genética da população faz referência à heterogeneidade na distribuição dos genótipos e da variabilidade genética dentro e entre as populações, com a finalidade de se descrever

como essa informação pode ser utilizada para a conservação e o manejo das espécies (KAMADA et al., 2009). Diante disso, esse trabalho teve por objetivo caracterizar a diversidade genética de variedades locais de mandioca mantidas e manejadas pelos agricultores tradicionais envolvidos na cadeia da farinha Uarini por meio de marcadores moleculares SSR e ISSR.

Esta pesquisa faz parte do projeto: “Interdisciplinaridade para o fortalecimento da cadeia produtiva da farinha Uarini - Etnobotânica e diversidade genética de *Manihot esculenta* Crantz”, aprovado no EDITAL N. 003/2020 – PAINTER/FAPEAM, coordenado pela Dra. Juliana Rodrigues Larrosa Oler. Está dividida em dois capítulos. Ambos descrevem sobre a diversidade genética de variedades locais de mandioca, envolvidas na cadeia produtiva da farinha Uarini por meio de marcadores moleculares, onde o primeiro capítulo está relacionado aos marcadores moleculares SSR e o segundo capítulo aos marcadores moleculares ISSR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Manihot esculenta* Crantz

A família Euphorbiaceae representa uma das maiores e mais diversas famílias de angiospermas, sendo que no Brasil, inclui cerca de 67 gêneros e 982 espécies, com ocorrência confirmada em todas as regiões brasileiras, apesar de não ser endêmica do país (SILVA et al., 2023). Dentro dessa família encontra-se o gênero *Manihot* que inclui 116 espécies (MARTINS et al., 2023), seus representantes podem ocorrer em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo e variam quanto ao hábito, podendo apresentar a forma de arbustos, subarbustos ou árvores (UMANAH & HARTMANN, 1973).

Manihot esculenta Crantz, conhecida popularmente como mandioca, macaxeira, aipim entre outros nomes (Figura 1), é um arbusto que vive em substrato terrícola, possui raízes espessamentos tuberosas alongadas redondas, seu caule pode chegar a 2,9 m de altura, é ereto, glabro e apresenta látex branco, já suas folhas são simples, lobadas, com lobos medianos maiores que os lobos laterais e estípulas triangulares persistentes (MARTINS et al., 2023), são profundamente recortadas, palmadas com três a sete lóbulos que estão presos a longos pecíolos (ROA et al., 1997).

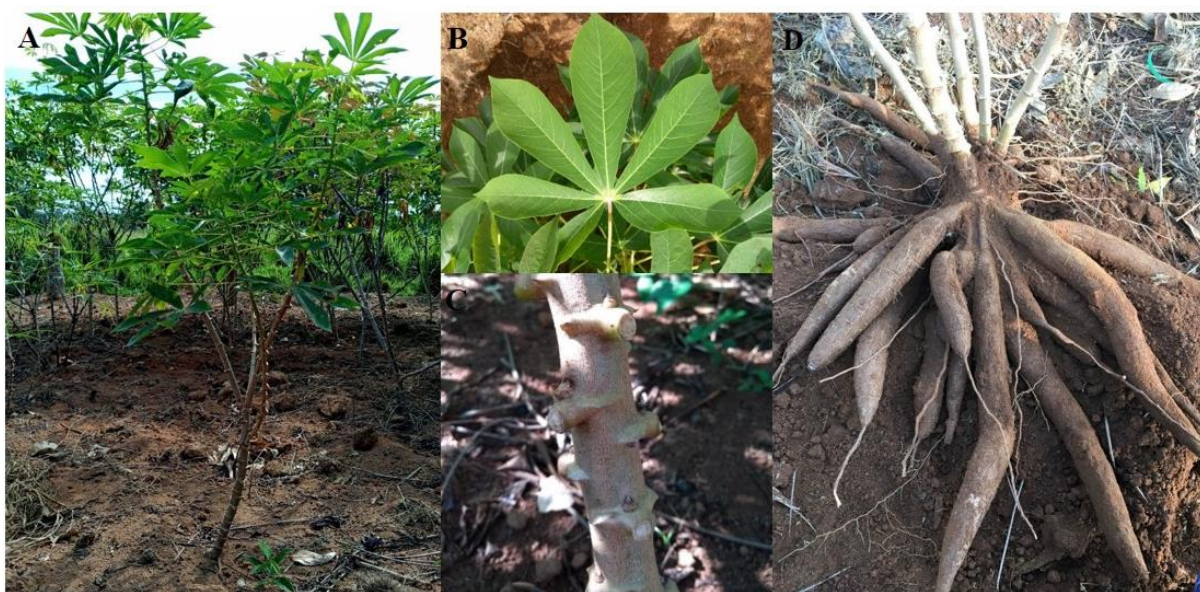


Figura 1. *Manihot esculenta*: Indivíduo adulto (A); Folha (B); Caule (C); Raízes (D). Fonte: Eliane C. M. Pedri 2022.

No Brasil possui distribuição geográfica nas regiões: Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí), Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais, São Paulo), nos domínios fitogeográficos da Amazônia e do Cerrado, em vegetações do tipo área antrópica, campo limpo, cerrado (*lato sensu*) e restinga (MARTINS et al., 2023).

A mandioca é uma das espécies mais importantes da família Euphorbiaceae, recebe várias denominações populares, e depois de diferentes pressões seletivas originaram-se mais de quatro mil variedades catalogadas, tendo variedades de mandioca brava, também chamada de mandioca amarga, e variedades de mandioca mansa, também conhecida como macaxeira, mandioca doce ou aipim (MÜHLEN et al., 2000; ELIAS et al., 2004).

A macaxeira, mandioca mansa ou aipim apresenta o teor de ácido cianídrico (HCN) abaixo de 50 mg kg⁻¹, e pode ser utilizada na alimentação humana para consumo *in natura*, fabricação de farinha, ou para a alimentação de animais. Quando o teor de HCN é maior que 100 mg kg⁻¹, é chamada de mandioca brava ou simplesmente mandioca, sendo geralmente usada na fabricação de farinha, fécula, ou como componente de ração animal, em forma de raspas, após secagem ao sol (FUKUDA et al., 2006).

2.2. Utilização e importância econômica

A mandioca é uma planta rústica, de fácil adaptabilidade, produzida em quase todos os países situados entre os trópicos de câncer e capricórnio, com bom desenvolvimento em solos pobres (HERRERA; ROSILLO; GARCÍA, 2007). Constitui um dos alimentos ricos em amido mais consumidos do mundo, sendo superado somente pelo arroz e o milho (AJAYI; OLUTUMISE, 2018).

No Brasil, a mandioca está presente no cardápio de todas as regiões brasileiras, desde o período pré-colonial até os dias atuais (MEZZETE et al., 2009). Além de ser consumida cozida, possui diversas utilidades, como a produção da fécula, que é incorporada no consumo de inúmeros produtos na indústria de massas, biscoitos

e fermento, fabricação de papéis, colas e tintas e nos frigoríficos para conservas em geral (PONCE; RIBEIRO; TELLES, 2020).

Além disso, possui um importante papel na alimentação humana e animal, servindo como matéria prima para muitos produtos industriais e para geração de emprego e renda, além de suas raízes serem comercializadas *in natura* em supermercados e feiras livres, durante todo o ano, são também encontradas congeladas, pré-cozidas e em forma de “chips”, bem como, destinadas às indústrias para fabricação de farinhas e produção de fécula (FIALHO & VIEIRA, 2013).

A produção nacional de raiz de mandioca no ano de 2021, foi de 18,09 toneladas colhidas em uma área total de 1,20 milhões de hectares, sendo o maior produtor o estado do Pará (IBGE, 2023). O ano de 2022 foi marcado pela alta de preços de mandioca, devido à baixa disponibilidade de raízes para comercialização, em decorrência da baixa produtividade das lavouras e problemas climáticos, já o ano de 2023 começou em um cenário um pouco melhor, havendo maior interesse pela colheita em janeiro (CONAB, 2023).

Dentre os produtos que compõem a cadeia produtiva da mandioca, a fécula é o maior destaque no que diz respeito a mercado internacional, já que a farinha é consumida internamente e a exportação de raízes ainda é incipiente. Durante o ano de 2022, foram exportadas 43,6 mil toneladas de fécula de mandioca, já o ano de 2023 iniciou dando continuidade à essa dinâmica, tendo sido exportadas aproximadamente 2,4 mil toneladas de fécula de mandioca. Assim como em 2022, em janeiro o maior importador da fécula brasileira foi o Paraguai, seguido pelos Estados Unidos (CONAB, 2023).

2.3. Cadeia Produtiva da Farinha Uarini

A cultura da farinha de mandioca no Brasil compõe uma tradição que persiste ao longo dos anos, além do grande valor cultural, vinculado ao conhecimento tradicional de herança indígena, possui também uma qualidade diferenciada tornando uma das principais fontes de alimentos da população local, juntamente com o peixe. Dentre os inúmeros tipos de farinha de mandioca produzida na região amazônica, está

a farinha Uarini, com seu sabor e notoriedade reconhecidos e valorizados pelos amazonenses (SENA, 2019).

A cadeia produtiva da farinha de mandioca é um importante recurso socioeconômico para o Estado do Amazonas, por fornecer um componente fundamental para dieta do cidadão amazonense, principalmente, àqueles pertencentes às classes menos favorecidas (DIAS et al., 1999), onde a base da alimentação é por vezes peixe com farinha (SCHOR et al., 2015). A produção de farinha representa uma importante fonte de renda e uma estratégia de segurança alimentar destas famílias, por gerar um grande número de empregos voltados à mão-de-obra familiar, devido a técnica tradicional de fabricação empregada nas casas de farinha (SENA, 2019).

No Amazonas além da mandioca ser utilizada para produção de farinhas (seca, d'água, temperada) também é muito empregada na culinária para o preparo de beiju, tapioca, carimã ou massa puba, tucupi, tacacá, dentre outros (LOBO et al., 2018). A fim de valorizar produtos de cunho cultural e regional foi criada a Indicação Geográfica (IG), que compreende um processo formal de reconhecimento de produtos com características distintivas associadas a um território, conferindo um registro específico ao coletivo de produtores envolvidos (BRANCO et al., 2012). A delimitação geográfica da IG Uarini compreende os municípios de Uarini, Alvarães, Tefé e Maraã, sendo que, o cultivo de mandioca e a produção da farinha nessa região estão fortemente presentes há muito tempo (IDSM, 2019).

A farinha de mandioca de Uarini se diferencia de outros produtos do mercado, carregando valor intrínseco, identidade própria e características do seu local de origem, bem como seu destaque pelo sabor, crocância, cor e seu formato ovalado. Seu processo produtivo contribui para a manutenção das práticas tradicionais, para conservação da floresta e ainda carrega a história dos agricultores locais, sendo caracterizada por sua produção agroecológica e livre de agrotóxicos, visto que, para controle de pragas, somente é autorizado o uso de fitossanitários permitidos pela legislação de orgânicos, regulamentado pela Lei nº 10.831 (BRASIL, 2003).

2.4. Recursos genéticos e conservação

O cultivo da mandioca geralmente é realizado, por agricultores familiares e o material de propagação provém de diferentes regiões, por meio das redes de circulação das manivas nas comunidades (EMPERAIRE & PERONI, 2007). A troca de manivas, a seleção e a reprodução sexuada, são essenciais na promoção da variabilidade e diversidade genética da espécie (SILVA et al., 2001; MARTINS, 2005; FIGUEREDO et al., 2019) que dão origem as variedades locais. O termo “variedades locais” é utilizado para definição do grupo de indivíduos identificados por nomenclatura popular local, expressando elementos do contexto cultural, econômico e social das populações associados ao seu uso (PERONI & MARTINS, 2000; EMPERAIRE & PERONI, 2007).

Os recursos genéticos da mandioca constituem uma ampla variabilidade genética, conservados e caracterizados por inúmeras instituições nacionais e internacionais de pesquisa (CARDOSO & FARIAS NETO, 2003). No Brasil, algumas instituições contam com bancos ativos de germoplasma associados com programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de novos cultivares adaptados às condições ambientais específicas (BARRETO & RESENDE, 2010).

Os bancos de germoplasma juntamente com outras coleções mantidas em instituições de pesquisa agrônômica constituem uma importante estratégia de conservação da agrobiodiversidade, a conservação *ex situ* (EMPERAIRE; VELTHEM; OLIVEIRA, 2008). Isso possibilita a preservação de genes por longos períodos e concentra diferentes materiais genéticos em apenas um local, facilitando a implementação de programas de melhoramento genético e a garantia de proteção da diversidade intraespecífica de espécies com ampla distribuição geográfica. Todavia, paralisa os processos evolutivos e torna-se oneroso devido à manutenção de equipamentos e estruturas necessários à conservação de diferentes tipos de materiais biológicos, além de depender da ação humana contínua por conta da grande concentração de material genético no local, conferindo vulnerabilidade à coleção (MMA, 2023).

Outra forma de conservar os recursos genéticos da mandioca é através da conservação *in situ*, que ocorre em condições as quais permitam a seleção natural,

acarretando em um aumento da base genética da espécie considerada, especialmente por meio da hibridação com espécies parentes silvestres, e a conservação *on farm*, que ocorre por meio do manejo realizado pelos agricultores com a pressão de seleção do mercado (EMPERAIRE; VELTHEM; OLIVEIRA, 2008).

A conservação *in situ* ocorre quando o recurso biológico é mantido e protegido em sua área de origem, como por exemplo, as áreas de reserva biológica, onde são mantidos os processos evolutivos, favorecendo a proteção das formas silvestres em melhores condições, com maior segurança da conservação de espécies com sementes recalcitrantes, e conservação de processos ecológicos importantes. Em contrapartida, possui altos custos devido à dependência de manejo e monitoramento constante dos locais, a exigência de extensas áreas, o que pode ser inviável dependendo da região, e a não garantia de conservação de toda a variabilidade genética de uma espécie, devido à conservação em apenas um ou poucos locais (MMA, 2023).

A conservação *on farm*, é uma estratégia complementar que também garante a continuidade dos processos evolutivos, sendo considerada um tipo de conservação *in situ*, que é realizada pelos agricultores. As três formas de conservação, *ex situ*, *in situ* e *on farm*, são complementares, formando a base para a implementar os três grandes objetivos da Convenção sobre Diversidade Biológica, visando conservar a diversidade biológica, usar de forma sustentável os seus componentes e repartir os benefícios derivados do uso dos recursos genéticos (MMA, 2023).

A ampla variabilidade genética presente no germoplasma da mandioca é fundamental para o desenvolvimento de cultivares produtivas, resistentes ou tolerantes a estresses biológicos e ambientais, tornando importante a sua conservação (BARRETO et al., 1999). O desenvolvimento de estratégias para a conservação de uma espécie conta principalmente com o entendimento de sua forma de reprodução, distribuição da diversidade genética dentro e entre populações, níveis de diversidade intrapopulacional, tamanho efetivo e distribuição espacial de genótipos (KAGEYAMA et al., 2003).

A caracterização molecular em estudos de diversidade genética, permite a distinção de indivíduos geneticamente diferentes ao detectar polimorfismo diretamente no DNA, sem influência ambiental (BORÉM & MIRANDA, 2005). Desse modo, a

caracterização molecular constitui um importante método para conhecer a diversidade genética existente, auxiliando na utilização dos recursos naturais, e podendo incluir novos materiais de interesse em programas de melhoramento genético, sendo base para o desenvolvimento de estratégias de conservação (SOUZA, 2015).

2. 5. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são caracteres com mecanismo de herança simples que podem ser utilizados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos, viabilizando a caracterização genética de um grande número de genótipos por meio de procedimentos relativamente simples e rápidos (BERED et al., 1997). Estes podem ser definidos como um segmento específico de DNA representativo das diferenças ao nível do genoma que possibilitam inferir de forma direta sobre a diversidade genética e inter-relações entre os organismos ao nível do DNA, por meio da detecção e a análise de polimorfismos genéticos (ZOLET et al., 2017).

Os marcadores moleculares microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), são sequências simples repetidas em tandem, que contém de um a seis nucleotídeos e estão presentes no genoma de eucariotos e procariotos (LI et al., 2002). São muito vantajosos por possuírem alta reprodutibilidade, polimorfismo abundante e codominância, sendo utilizados com frequência em estudos de genética de populações (JARNE & LAGODA, 1996). Esses marcadores contêm características desejáveis para o uso em estudos de genética de populações (VIEIRA et al., 2016), por apresentar herança codominante, serem altamente polimórficos e multialélicos (BORÉM; CAIXETA, 2016).

Dentre os principais marcadores moleculares utilizados está o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), que são sequências simples repetidas dispersas ao longo do genoma. A técnica ISSR é baseada na amplificação de regiões genômicas entre duas sequências simples repetidas através da PCR, sendo utilizado em estudos de diversidade e variabilidade genética por não necessitar de informação prévia da sequência de DNA e pelos procedimentos laboratoriais poderem ser transferidos para qualquer espécie de planta (BARTH et al., 2002; REDDY et al., 2002; SOUZA et al.,

2005). Esta técnica pode resultar em elevado grau de polimorfismo, apresentar alta reprodutibilidade e ter baixo custo (SANTANA et al., 2011; BRAGA, 2013).

Neste sentido, diversos estudos são encontrados na literatura utilizando esses marcadores moleculares como ferramentas para caracterizar a diversidade genética da mandioca. Cuchi et al. (2022), objetivando realizar a caracterização molecular e avaliar a diversidade genética entre 19 variedades locais de mandioca coletadas no município de Paranaíta –MT, verificaram a existência da diversidade genética por meio dos *primers* ISSRs. Wolf et al. (2022), também constataram diversidade genética ao caracterizar 15 variedades locais de mandioca cultivadas no norte do estado de Mato Grosso, evidenciando a eficiência dos *primers* ISSRs na detecção de polimorfismos.

Pedri et al. (2019), estudando as variedades locais de mandioca cultivadas no norte do estado de Mato Grosso, constataram uma considerável diversidade genética nas populações de *M. esculenta* por meio de marcadores microssatélites, destacando os plantios como uma forma de conservação *in situ* da variabilidade genética da espécie. Também utilizando os marcadores microssatélites, Tiago et al. (2019), buscaram avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional das variedades locais de mandioca cultivadas em propriedades familiares em seis municípios do estado de Mato Grosso, e obtiveram alta diversidade genética, propondo-se que todas as populações sejam conservadas, uma vez que têm potencial para serem usadas no melhoramento genético dessa cultura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.; MURRIETA, R.; SIQUEIRA, A.; NEVES, W.; SANCHES, R. O pão da terra: da invisibilidade da mandioca na Amazônia. **Sociedades caboclas amazônicas: modernidade e invisibilidade**, p. 295-321. 2008.
- AJAYI, C. O.; OLUTUMISE, A. I. Determinantes da segurança alimentar e eficiência técnica dos agricultores de mandioca no Estado de Ondo, Nigéria. **International Food and Agibusiness Management Review**, v. 21, n. 7, p. 915-928, 2018.
- BARRETO, J. F.; RESENDE, M. D. V. Avaliação genotípica de acessos de mandioca no Amazonas e estimativas de parâmetros genéticos. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 35, n. 2, p.131-136, 2010.
- BARRETO, J.; MARTINS, G.; XAVIER, J.; DIAS, M. **Conservação e caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no Amazonas**. In: Congresso Brasileiro de Mandioca, 10., 1999, Manaus. Mandioca: sua importância frente à globalização da economia: resumos. Cruz das Almas: SBM, 1999. p. 29.
- BARTH, S., MELCHINGER, A. E.; LUBBERSTEDT, T. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 3, p. 495-505, 2002.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, p. 513-520, 1997.
- BERNARDO, C. O.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 739-746, 2016.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2016. 385p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. 525p.
- BRAGA, I. **Discriminação varietal de cultivares em *Urochloa brizantha* por marcador molecular ISSR**. 52 f. Dissertação (Mestrado de Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2013.
- BRANCO, N. P. N. C. S.; CAZUMBÁ, I. R. S.; ANDRADE, A. C. B.; CARDOSO, R. C. V.; DRUZIAN, J. I. Projeto de contribuição à Indicação Geográfica para farinha de mandioca de tipo Copioba: a construção de indicadores sociais para avaliação de impactos em desenvolvimento. **Revista Geintec: Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 4, p. 396-412, 2012.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003 - Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Brasília, DF, 23 de dezembro de 2003. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.831.htm>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CARDOSO, E. M. R.; FARIAS NETO, J. T. Diversidade genética entre acessos de mandioca avaliados a partir de caracteres morfoagronômicos. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n. 39, p.109-121, 2003.

CARRASCO, N. F. et al. Growing Cassava (*Manihot esculenta*) in Mato Grosso, Brazil: Genetic Diversity Conservation in Small-Scale Agriculture. **Economic Botany**, v.70, n. 15, 2016.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Mandioca – Análise Mensal – Dezembro/2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_16_14_33_30_17.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620p.

CUCHI, G.; SANTOS CARDOSO, E.; PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; ZORTÉA, K. É. M.; ROSSI, A. A. B. Caracterização molecular de etnovariedades de *Manihot esculenta* Crantz com utilização de marcadores moleculares ISSR. **Conjecturas**, v. 22, n. 13, p. 747-764, 2022.

DIAS, M. C. X.; BARRETO, J. J. B. N.; FERDINANDO, J. Cadeia produtiva da mandioca no Amazonas. Manaus: **EMBRAPA** / CPAA / SEBRAE-AM, 1999.

ELIAS, M.; MÜHLEN, G. S.; MCKEY, D.; ROA, C.; TOHME, J. Genic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**, v.58, n.2, p.242-56, 2004.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: processamento da mandioca**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: SEBRAE, 2003, 115p.

EMPERAIRE, L.; VELTHEM, L.; OLIVEIRA, A. G. Patrimônio cultural imaterial e sistema agrícola: o manejo da diversidade agrícola no médio Rio Negro Amazonas. In: REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANTROPOLOGIA, 26., 2008, Porto Seguro, Bahia. **Anais...** Bahia: UFBA, 2008.

FARALDO, M. I. F.; SILVA, R. M.; ANDO, A.; MARTINS, P. S. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 3, p. 499-505, 2000.

FIALHO, J. F.; VIEIRA, E. A. **Mandioca no Cerrado**. Brasília: Embrapa Cerrados. (Orientações técnicas). 2013. 203p.

FIGUEREDO, P. E.; TIAGO, A. V.; ZANETTI, G. T.; PINTO, J. M. A.; ROSSI, A. A. B.; HOOGHEIDE, E. S. S. Diversidade genética de mandiocas na região periurbana de Sinop, Mato Grosso, Brasil. **Magistra**, v. 30, p. 143–153, 2019.

FUKUDA, W. M. G.; CAVALCANTI, J.; FUKUDA, C.; COSTA, I. R. S. Variabilidade genética e melhoramento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. 2005.

FUKUDA, W. M. G.; FUKUDA, C.; DIAS, M. C.; XAVIER, J. J. B. N.; FIALHO, J. F. Variedades. Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 2006. p. 433-454.

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. **Melhoramento de mandioca no Brasil**. In: CEREDA, M. P. (Ed.) Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 540 p.

GALERA, J. M. S. V.; VALLE, T. L. Estruturação genética do germoplasma de mandioca através de informação comparativas entre estudos biológicos e antropológicos – resultados preliminares. **Revista raízes e amidos Tropicais**, v. 3, n. 1, p. 363-366, 2007.

GOEDERT, W. J. Apresentação. In: Mandioca no Cerrado: orientações técnicas/ editores técnicos, Josefino de Freitas Fialho, Eduardo Alano Vieira. –Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2011. 208 p.

HERRERA, C. A.; ROSILLO, M. E.; GARCÍA, A. Separação de farinha de mandioca em um ciclone inverso. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 5, p. 515–520, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mandioca/br>>. Acesso em: 16 mar. 2023.

IDAM - Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas. **Cartilha: Como Cultivar Mandioca**. Manaus, AM: 2019. p. 4.

IDSMA - Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. **Farinha Uarini ganha selo de Indicação Geográfica**, 2019. Disponível em: <<https://www.mamiraua.org.br/noticias/farinha-uarini-amazonia-indicacao-geografica>>. Acesso em: 31 jan. 2023.

ISENDAHL, C. The domestication and early spread of manioc (*Manihot esculenta* Crantz): a brief synthesis. **Latin American Antiquity**, v. 22, n. 4, p. 452-468, 2011.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Tree**. 11: 424-429, 1996.

KAGEYAMA, P. O.; CUNHA, G. C.; BARRETO, K. D.; GANDARA, F. B.; CAMARGO, F. R. A.; SEBBENN, A. M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorífera* (Lauraceae). **Scientia Forestalis**. 64: 108-119, 2003.

KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; VIEIRA, R. F.; OTONI, W. C. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 403 - 409, 2009.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A. NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**. 11: 2453-2465, 2002.

LOBO, L. D.; SANTOS JÚNIOR, C. F.; NUNES, A. Importância socioeconômica da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para a comunidade de Jaçapetuba, município de Cametá, PA. **Multitemas**, Campo Grande, MS, v. 23, n. 55, p. 195-211, set./dez. 2018.

LOUREIRO, A. C.; SOARES, J. V. S.; CHAAR, J. S.; HIDALGO, A. F.; SOUZA, L. D. S. S.; PEREIRA, A. M. Avaliação do potencial dos resíduos (casca, entrecasca e pontas) do beneficiamento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para a produção de bioetanol utilizando hidrólise ácida. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 2, p. 606-620, 2020.

MACEDO, K. R. Utilização da parte aérea da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na alimentação de frango de corte de linhagem caipira-revisão de literatura. **Revista Veterinária em Foco**, v. 13, n. 2, 2016.

MARTINS, M. L. L.; ORLANDINI, P.; MENDOZA F., J. M.; SILVEIRA, T. C. *Manihot* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB17600>>. Acesso em: 16 jan. 2023.

MARTINS, P. A. S.; QUERINO, C. A. S.; MOURA, M. A. L.; QUERINO, J. K. A. S.; MOURA, A. R. M. Variabilidade espaço-temporal de variáveis climáticas na mesorregião sul do Amazonas. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.2, p.169-184, 2019.

MARTINS, P. S. **Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos**. Estudos Avançados, v. 19, n. 53, p. 209-220, 2005.

MARTINS, P. S.; OLIVEIRA, G. C. X. **Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos**. In: VIEIRA, I. C. G.; SILVA, J. M. C.; OREN, D. C.; D'INCAO, M. A. Diversidade biológica e cultural da Amazônia. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2009. 373-391p.

MMA - **Ministério do Meio Ambiente**. Conservação *in situ*, *ex situ* e *on farm*. Disponível em < <https://antigo.mma.gov.br/>> Acesso em 20 mar 2023.

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

PEDRI, E. C. M.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; TIAGO, A. V.; CARDOSO, E. D. S.; PINTO, J. M. A.; SANTOS, L. L.; ROSSI, A. A. B. Genetic diversity of cassava landraces cultivated in northern Mato Grosso State, Brazil, using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 3, 2019.

PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; CARDOSO, E. S.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; ROSSI, A. A. B. Are floral characters efficient in the phenotypic differentiation of cassava landraces? **Scientia Plena**, v. 18, n. 2, 2022.

PERONI, N.; MARTINS, P. S. Influência da dinâmica agrícola itinerante na geração de diversidade de etnovariedades cultivadas vegetativamente. **Interciencia**, v. 25, n. 1, 2000.

PONCE, T. P.; RIBEIRO, M. R.; TELLES, T. S. Dinâmica espacial da produção de mandioca no Paraná, Brasil. **Revista franco-brasileira de geografia**, n. 48, dez. 2020.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, n.1, p.9-17. 2002.

RIVAL, L.; MCKEY, D. Domestication and diversity in manioc (*Manihot esculenta* Crantz ssp. *esculenta*, Euphorbiaceae). **Current Anthropology**, v. 49, n. 6, p. 1119-1128, 2008.

ROA, A. C.; MAYA, M. M.; DUQUE, M. C.; TOHME, J.; ALLEM, A. C.; BONIERBALE, M. W. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. **Theoretical and Applied Genetics**, vol. 95, p. 741-750, 1997.

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

SCHOR, T.; TAVARES-PINTO, M. A.; AVELINO, F. C. C.; RIBEIRO, M. L. Do peixe com farinha à macarronada com frango: uma análise das transformações na rede urbana no Alto Solimões pela perspectiva dos padrões alimentares. **Revista Franco-Brasileira de Geografia**, n. 24, 2015.

SENA, R. R. **Sistema de produção em casas de farinha: uma contribuição ao processo de consolidação da indicação geográfica da farinha Uarini**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2019. 233p. (Tese – Doutorado em Administração).

SILVA, O. L. M.; SECCO, R. S.; CORDEIRO, I.; CARUZO, M. B. R.; KÜLKAMP, J.; FARIAS, S. Q.; ORLANDINI, P.; MEDEIROS, D.; MARTINS, M. L. L.; TORRES, D. S. C.; RIINA, R.; CORDEIRO, W. P. F. S. et al. **Euphorbiaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB113>>. Acesso em: 16 mar. 2023.

SILVA, R. M.; BANDEL, G.; FARALDO, M. I. F.; MARTINS, P. S. Biologia reprodutiva de etnovariedades de mandioca. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 101-107, 2001.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

SOUZA, V. Q.; PEREIRA, A. S.; MARINIKOPP, M.; COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F.; LUZ, V. K.; OLIVEIRA, A. C. Dissimilaridade genética em mutantes da aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 569 - 575, 2005.

TIAGO, A. V.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; PEDRI, E. C. M.; CARDOSO, E. D. S.; PINTO, J.; PENA, G.; ROSSI, A. Genetic diversity and population structure of cassava ethno-varieties grown in six municipalities in the state of Mato Grosso, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 4, 2019.

UMANAH, E. E.; HARTMANN, R. W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.98, p.272-274, 1973.

VIEIRA, L. J.; TAVARES FILHO, L. F. Q.; SOUZA, F. V. D.; ALVES, A. A. C.; OLIVEIRA, E. J. Development of interspecific hybrids of cassava and paternity analysis with molecular markers. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 151, p. 849-861, 2013.

VIEIRA, M. L. C. et al. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

WOLF, M. S.; CUCHI, G.; DE PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; SILVA, M. C. M.; ROSSI, A. A. B. Diversidade genética entre etnovariedades de mandioca por meio de marcadores ISSR. **Conjecturas**, v. 22, n. 16, p. 532-546, 2022.

ZOLET, A. C. T.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. **Sociedade Brasileira de Genética**, 2017. 181 p.

4.1 CAPÍTULO I

Diversidade genética de variedades locais de mandioca envolvidas na cadeia produtiva da farinha Uarini por meio de marcadores moleculares SSR

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euphorbiaceae Juss., possui forma de vida arbustiva e se desenvolve em substrato terrícola (MARTINS et al., 2023). É produzida em todo Brasil por apresentar fácil adaptação a diferentes climas e solos, além de representar papel importante na geração de emprego e renda aos pequenos e médios produtores rurais, principalmente na Amazônia, onde possui inúmeras utilidades na culinária local, como produção de farinhas, beiju, tapioca, massa puba, tucupi, entre outros (LOBO et al., 2018).

O estado do Amazonas é o segundo maior produtor de mandioca da região Norte, tendo boa parte da produção regionalmente beneficiada nas chamadas casas de farinha, caracterizadas pelo uso de técnicas e utensílios tradicionais, em alguns casos, tecnologias sociais que garante aspectos artesanais da produção, dificultando o controle de qualidade sendo necessário acompanhamento técnico adequado, que alie conhecimento tradicional e métodos de garantia de qualidade, uma vez que, a farinha é o principal subproduto de consumo de muitas comunidades amazonenses (IDAM, 2019).

A cadeia produtiva da farinha de mandioca é um importante recurso socioeconômico para o Estado do Amazonas por fornecer um componente fundamental para dieta do cidadão amazonense, principalmente, o pertencente às classes menos favorecidas (ARACATY; SOARES, 2023), onde a base da alimentação é por vezes peixe com farinha (SCHOR et al., 2015). Dentre os inúmeros tipos de farinha de mandioca produzida na região amazônica a farinha Uarini se destaca pelo seu sabor e notoriedade tão reconhecidos e valorizados pelos amazonenses (SENA, 2019).

As variedades locais de mandioca são as principais matérias primas utilizadas nas casas de farinha amazonenses. Esta espécie possui alta variabilidade genética e ampla distribuição pelo Brasil (GALERA; VALLE, 2007), oriunda da atividade de troca de manivas entre agricultores familiares, que, normalmente, cultivam mais de duas variedades em suas roças e veem atuando como mantenedores da diversidade local (MARTINS; OLIVEIRA, 2009), bem como a presença de parentes silvestres e

sistema sexuado ativo, uma vez que consiste em uma espécie monoica e alógama, com polinização preferencialmente cruzada, geralmente realizada por coleópteros, vespas, abelhas irapuá (*Trigona spinipes*) e abelhas (*Apis mellifera*), tendo a autogamia impedida pelo mecanismo de autoincompatibilidade temporal protoginia (CEBALLOS; CRUZ, 2002; SILVA et al., 2001).

A atividade de troca de manivas entre agricultores familiares juntamente com a presença de parentes silvestres e sistema sexuado ativo podem constituir uma forma de recurso genético a ser conservado e utilizado em programas de melhoramento por apresentarem genes de resistência e de fácil adaptação (FUKUDA et al., 2005). Para a conservação da espécie é fundamental conhecer a diversidade genética, através de métodos como a caracterização molecular que auxilia no conhecimento e, posterior, utilização dos recursos genéticos naturais, fornecendo informações para o desenvolvimento de estratégias de conservação e para seleção de materiais de interesse em programas de melhoramento genético (SOUZA, 2015).

Para estudos de caracterização molecular os marcadores microssatélites (SSR), são importantes ferramentas que podem ser utilizadas, pois contêm características desejáveis para serem aplicadas em estudos de genética de populações (VIEIRA et al., 2016), por apresentar herança codominante, serem altamente polimórficos e multialélicos (BORÉM; CAIXETA, 2016). Diante disso, este estudo objetiva caracterizar a diversidade genética de variedades locais de mandioca mantidas e manejadas pelos agricultores tradicionais envolvidos na cadeia da farinha Uarini por meio de marcadores moleculares SSR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e amostragem

A amostragem foi realizada na delimitação geográfica da área determinada pela Identificação Geográfica (IG) Farinha Uarini, que compreende os municípios de Uarini, Alvarães, Tefé e Marã, localizados do estado do Amazonas (Figura 1) com as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 2° 59' 38" Sul, Longitude: 65° 6' 31" Oeste; Latitude: 3° 13' 17" Sul, Longitude: 64° 48' 16" Oeste; Latitude: 3° 19' 15" Sul, Longitude: 64° 43' 25" Oeste; Latitude: 1° 49' 28" Sul, Longitude: 65° 21' 31" Oeste, respectivamente. Neste estudo, cada município foi considerado como uma população.

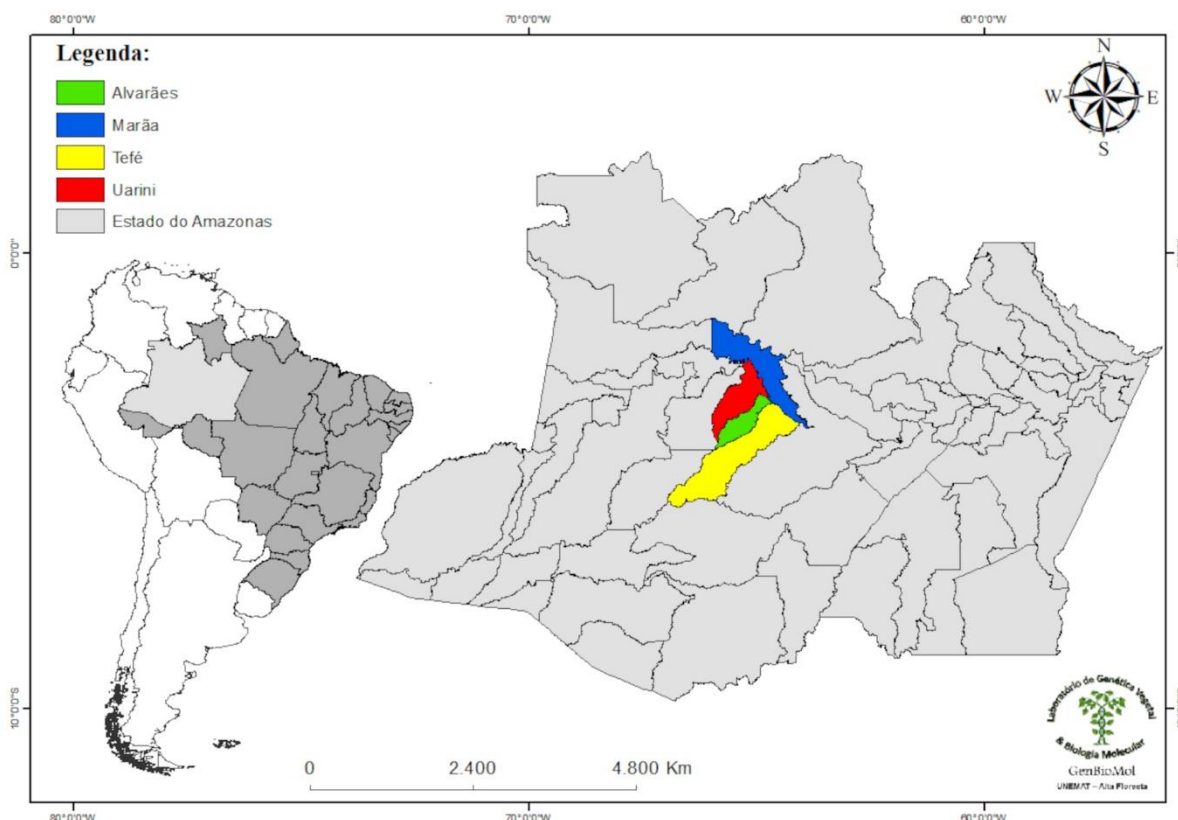


Figura 1. Mapa de localização dos municípios amostrados no estado do Amazonas.

De acordo com dados do IBGE (2023) estes municípios possuem sua economia baseada na agropecuária e na extração vegetal de castanha, açaí e madeira. Outra atividade muito importante é a produção e comercialização da farinha de mandioca, que garante a segurança alimentar e a geração de emprego e renda. Neste sentido, destaca-se a cadeia produtiva da farinha Uarini, muito consumida na região, e devido à IG, se diferencia de outros produtos do mercado, carregando valor intrínseco,

identidade própria e características do seu local de origem. As mandiocas são cultivadas para a produção da farinha Uarini pela rede da Associação de Produtores de Farinha de Mandioca da Região de Uarini (APRU), aberta em 08/02/2017, que consiste em uma matriz do tipo Associação Privada situada em Tefé – AM.

A princípio, todos os agricultores que constam listados como sócios fundadores e/ou membros atuais da APRU foram identificados com intuito de buscar representatividade em todos os municípios contemplados pela IG, onde seriam visitadas roças de agricultores em cada município. Contudo, devido aos impactos da pandemia da COVID-19, houve uma alteração na forma de seleção dos agricultores para a realização do estudo.

A chegada da COVID-19 atingiu fortemente a região Amazônica, segundo compilação realizada até dia 20 de junho de 2020, quatro dos cinco estados brasileiros com o maior número de casos, localizam-se na região, sendo eles Amapá, Amazonas, Roraima e Acre (COTA, 2020). Isso gerou grandes impactos, principalmente nas áreas das periferias de cidades da região Norte do país, culminando no fechamento de comércios e na diminuição de ofertas de empregos e serviços, sobrecarregando os serviços de saúde, paralisando atividades escolares e dentre outras, além de mudanças nas dinâmicas sociais nas comunidades e cidades localizadas nesta região (SILVA et al., 2020). Esses impactos da pandemia acarretaram em mudanças na metodologia desse estudo, sendo indicados pelo presidente da APRU pelo menos três agricultores de cada município com disponibilidade de transportar as amostras até a sede do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, no município de Tefé.

Foram coletadas duas folhas jovens e totalmente expandidas de 13 variedades locais de mandioca mais frequentes nos cultivos dos agricultores no município de Uarini, 19 no município de Alvarães, 9 no município de Tefé e 7 no município de Marã, perfazendo um total de 48 variedades locais nas quatro populações.

As folhas foram identificadas em campo com código (Tabela 1) e acondicionadas em saco plástico com fecho hermético juntamente com sílica gel. Posteriormente, foram despachadas via Sedex para a Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), campus de Alta Floresta, nas dependências do Centro de Pesquisa e Tecnologia da Amazônia Meridional

(CEPTAM), Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol). No laboratório, as amostras foram retiradas da sílica e acondicionadas em sacos de alumínio devidamente identificados e armazenadas em freezer -20 C°, para posterior extração de DNA.

Tabela 1. Número e código atribuídos a cada variedade local coletada nos respectivos municípios

Número	Código	Nome da variedade local	Município
1	U01	<i>Baixotinha</i>	Uarini
2	U02	<i>Achada preta</i>	Uarini
3	U03	<i>Manivão</i>	Uarini
4	U04	<i>Catombo Normal</i>	Uarini
5	U05	<i>Antinha</i>	Uarini
6	U06	<i>Antinha Preta</i>	Uarini
7	U07	<i>Antinha Branca</i>	Uarini
8	U08	<i>Catombo Normal</i>	Uarini
9	U09	<i>Vermelhinha</i>	Uarini
10	U10	<i>Antinha Branca</i>	Uarini
11	U11	<i>Catombo Normal</i>	Uarini
12	U12	<i>Catombo Direita</i>	Uarini
13	U13	<i>Antinha</i>	Uarini
14	A01	<i>Baixotinha</i>	Alvarães
15	A02	<i>Catombo</i>	Alvarães
16	A03	<i>Manteguinha</i>	Alvarães
17	A04	<i>Baixotinha</i>	Alvarães
18	A05	<i>Catombo</i>	Alvarães
19	A06	<i>João Gonçalves</i>	Alvarães
20	A07	<i>Sacái</i>	Alvarães
21	A08	<i>Macaxeira Pão</i>	Alvarães
22	A09	<i>Pretinha</i>	Alvarães
23	A10	<i>Italiana</i>	Alvarães
24	A11	<i>Macaxeira branca</i>	Alvarães
25	A12	<i>Samauma</i>	Alvarães
26	A13	<i>Macaxeira branca</i>	Alvarães
27	A14	<i>João Gonçalves</i>	Alvarães
28	A15	<i>Catombo</i>	Alvarães
29	A16	<i>João Gonçalves</i>	Alvarães
30	A17	<i>Samauma</i>	Alvarães
31	A18	<i>Catombinho</i>	Alvarães
Tabela 1, Cont...			
32	A19	<i>Catombo</i>	Alvarães

33	M01	<i>Catombo</i>	Maraã
34	M02	<i>Angelina</i>	Maraã
35	M03	<i>Catombinho</i>	Maraã
36	M04	<i>Baixotinha</i>	Maraã
37	M05	<i>7 anos</i>	Maraã
38	M06	<i>Catombo</i>	Maraã
39	M07	<i>Angelina</i>	Maraã
40	T01	<i>João Gonçalo</i>	Tefé
41	T02	<i>7 anos</i>	Tefé
42	T03	<i>Samauma</i>	Tefé
43	T04	<i>Catombo</i>	Tefé
44	T05	<i>Catombo</i>	Tefé
45	T06	<i>Catombinho</i>	Tefé
46	T07	<i>Baixotinha</i>	Tefé
47	T08	<i>Catombo</i>	Tefé
48	T09	<i>João Gonçalo</i>	Tefé

2.2. Extração do DNA

O DNA genômico total foi extraído de, aproximadamente, 100 mg do material foliar seguindo o método Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações sugeridas por Tiago et al. (2016), para a espécie: aumento da concentração de polivinilpirrolidona (PVP) de 1% para 2% e de β -mercaptoetanol de 0,2% para 1,8% no tampão de extração; adição de 0,4% de proteinase K no tampão de extração; redução do tempo de incubação a 65  C de 60' para 30'.

O material foliar foi triturado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo de porcelana (Figura 2A, 2B e 2C). O p  resultante foi transferido, em duplicata, para microtubos de 2 mL (Figura 2D), aos quais foram adicionados 800 μ L de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 5% CTAB; 2% PVP e 1,8% de β -mercaptoetanol) (Figura 2E). Após agitação de um minuto em vórtex os microtubos foram incubados a 65  C por 30 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 700 μ L de clorofórmio:  lcool isoamílico 24:1 (v:v) e subsequente agitação em vórtex e centrifugação a 12.000 rpm por 10' (Figura 2F). O sobrenadante (Figura 2G) foi transferido a um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado novamente 700 μ L de clorofórmio:  lcool

isoamílico 24:1 (v:v). Os tubos foram agitados novamente em vórtex e centrifugados mais uma vez a 12.000 rpm por 10', o sobrenadante (Figura 2H) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, sendo em seguida adicionado 500 µL de isopropanol gelado (-20 °C). Os tubos foram armazenados por três horas em freezer a -20 °C para precipitação do DNA. Após esse período os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10' e o precipitado (Figura 2I) foi lavado duas vezes com etanol 70%, uma vez com etanol 95% e seco à temperatura ambiente. O precipitado foi então ressuspendido em 40 µL de TE 0,1 mM (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase na concentração de 40 µg/µL e incubados em banho-maria a 37 °C por, aproximadamente, 30'. Posteriormente, os microtubos foram armazenados em geladeira a 4 °C por 24 h e depois em freezer (-20 °C).

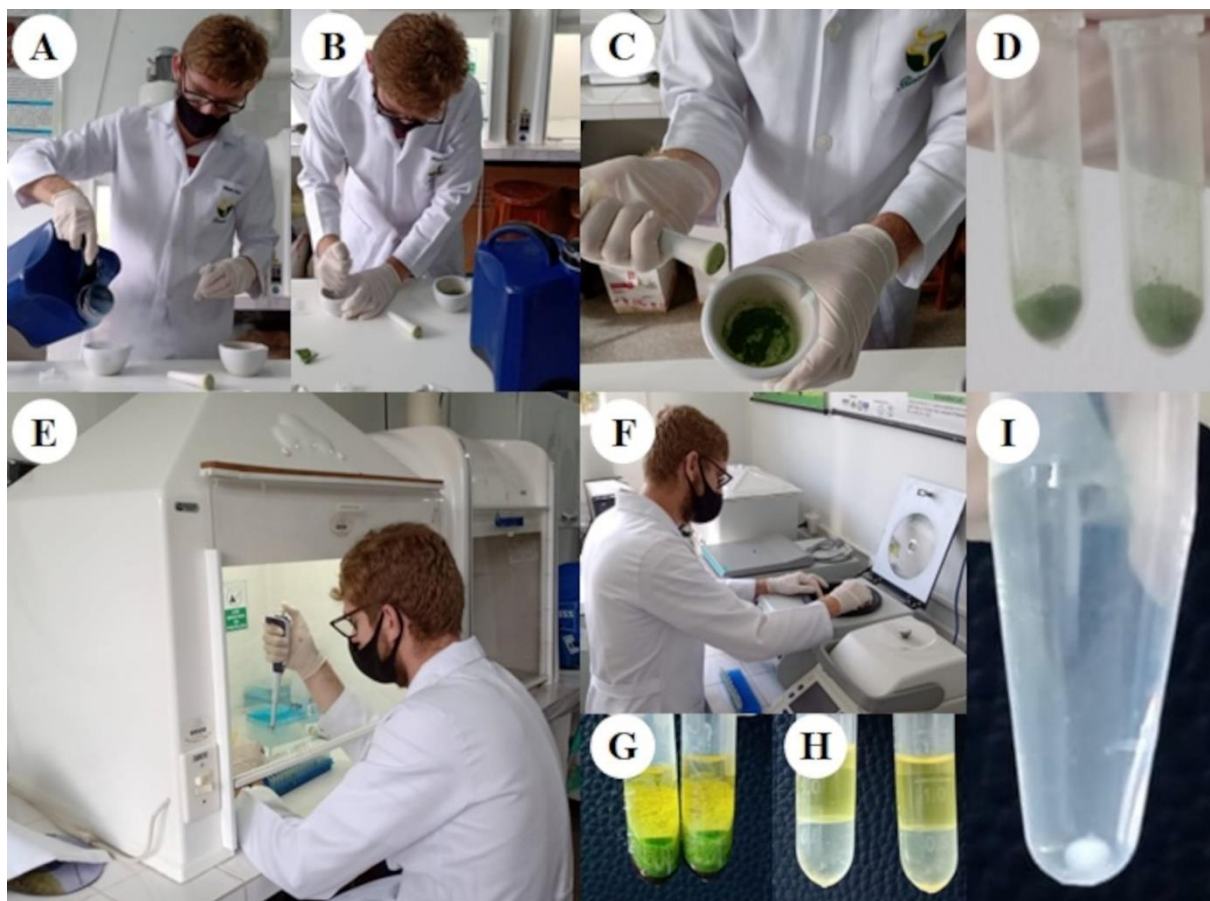


Figura 2. Extração de DNA total de tecido foliar de *Manihot esculenta*. Quebra mecânica do tecido foliar com nitrogênio líquido (A, B e C); pó resultante da quebra mecânica (D); processo de extração sendo realizado na capela de exaustão (E); processo de centrifugação (F); separação da fase aquosa (sobrenadante) dos constituintes celulares após inserção do tampão e centrifugação (G); separação das fases após lavagem seguida de centrifugação (H); *Pellet* (I).

A qualidade e a concentração do DNA foram verificadas no micro espectrofotômetro NANO-300 e por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 µg/mL) e por comparação com marcador de DNA λ de 100 ng/µL (Figura 3). A partir da quantificação foi feita a diluição das amostras de DNA em água destilada autoclavada para a concentração de 100 ng/µL para uso nas amplificações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

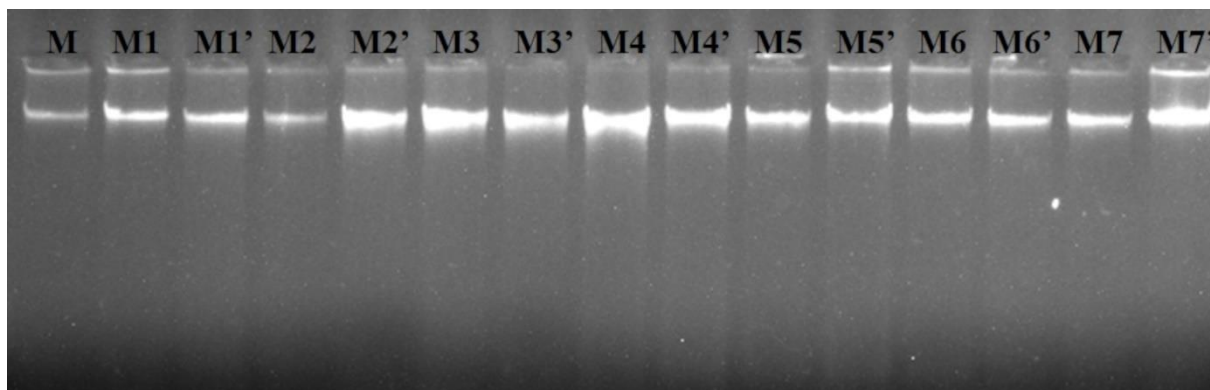


Figura 3. Quantificação do DNA total de sete indivíduos (em duplicata) de *Manihot esculenta* da população de Maraã, por meio de eletroforese utilizando gel de agarose 1%. Marcador de DNA λ de 100 ng/µL (M).

2.3. Caracterização molecular e amplificação via PCR

Para a análise da diversidade genética foi empregado 12 *primers* SSR (*Simple Sequence Repeat*), sendo cinco (GA12, GA21, GA131, GA136 e GA140) desenvolvidos por Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) e sete (SSRY08, SSRY21, SSRY27, SSRY28, SSRY35, SSRY40 e SSRY43) por Mba et al. (2001).

As reações de amplificações foram realizadas utilizando os 12 *primers* microsatélites marcados com fluorocromo, FAM (azul), VIC (verde) e NED (amarelo), conforme a Tabela 3, e seguindo o protocolo proposto por Schuelke (2000) com adaptações feitas por Tiago et al. (2019). Para PCR foram utilizadas reações com um volume total de 10 µL, contendo 1 µL de Buffer [0,05% (w/v) azul de bromofenol, 40% (w/v) sacarose, 0,1 M EDTA pH 8.0, 0,5% (w/v) sodium lauryl sulfate (SDS)]; 0,8 µL de dNTPs (2,5 mM); 0,13 µL e 0,25 µL para cada *primer* [*forward* e *reverse* (10 µM), respectivamente]; 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (5 U); 0,25 µL da marcação FAM, VIC e NED (1 µM); 2 µL DNA (100 ng/µL), e água ultrapura Milli-Q[®] até completar o volume total.

Tabela 2. *Primers* microssatélites marcados com fluorocromos (FAM, VIC e NED) e a amplitude alélica utilizados neste estudo

<i>Primer</i>	Amplitude alélica (pb)	<i>Primer</i>	Amplitude alélica (pb)	<i>Primer</i>	Amplitude alélica (pb)
GA131	75-163	GA140	154-204	SSRY43	225-275
GA21	104-166	SSRY28	160-204	SSRY27	245-317
GA12	119-165	SSRY21	172-212	SSRY35	240-310
GA136	127-185	SSRY40	211-255	SSRY08	268-314
FAM		VIC		NED	

As amplificações foram realizadas em termociclador Biocycler, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos seguidos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; temperatura de anelamento de 45°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e oito ciclos a 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos das amplificações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 4), com tampão TAE 0,5 X, voltagem constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sobre transiluminador de luz ultravioleta L-PIX Image (Loccus Biotecnologia).

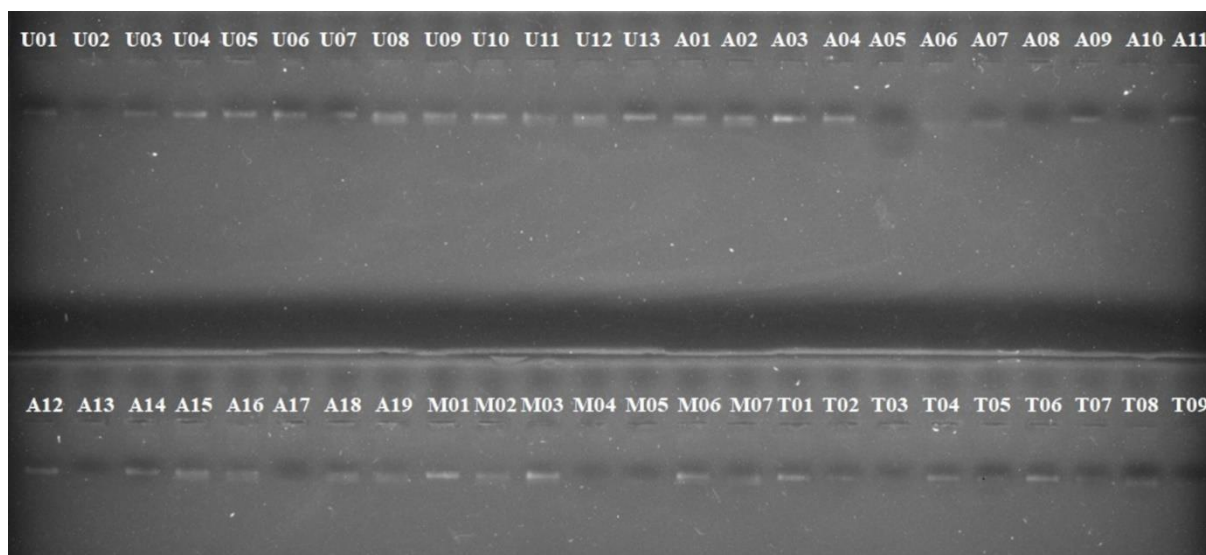


Figura 4. Resultado da amplificação via PCR, utilizando o *primer* microssatélite GA140, submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, com amostras de 48 indivíduos de variedades locais de *Manihot esculenta*, divididos em quatro populações. (Uarini, U01-U13); (Alvarães, A01-A19); (Maraã, 01-07); e (Tefé, T01-T09).

Após a amplificação as amostras foram encaminhadas para o Centro de Pesquisa René Rachou, na Plataforma de Sequenciamento de DNA capilar - RPT01E da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em Belo Horizonte, Minas Gerais, para a

realização da Análise de Fragmentos Microsatélites (Genotipagem). A detecção automatizada dos microsatélites foi possível devido à presença dos fluorocromos ligados à extremidade 5' dos *primers* forward. A genotipagem foi realizada através da estimativa do tamanho dos alelos amplificados para cada microsatélite, utilizando como base o tamanho conhecido dos picos do padrão marcado com o fluorocromo GeneScan™ 500 LIZ™.

Após a eletroforese capilar, os arquivos gerados contendo os picos de eletroferogramas, foram visualizados e analisados através do programa computacional GeneMarker v.2.6.3 (Demo), sendo possível fazer a distinção de indivíduos homozigotos e heterozigotos (Figura 5).

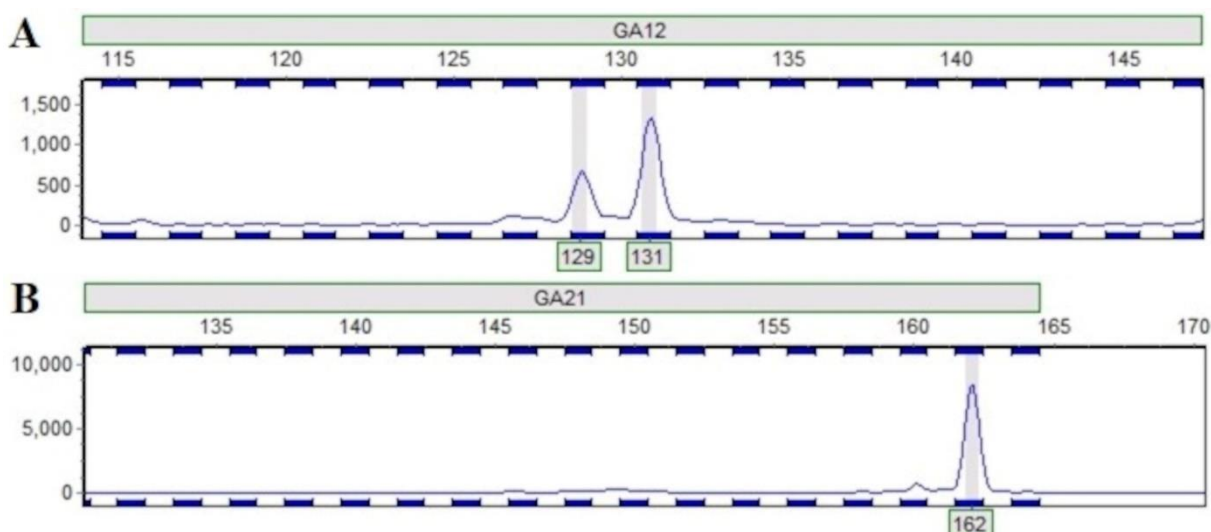


Figura 5. Picos de fluorescência encontrados na genotipagem dos indivíduos de *Manihot esculenta* e detecção do tamanho dos fragmentos amplificados. *Primer* GA12 marcado com a fluorescência FAM (azul), heterozigoto (A); *primer* GA21 marcado com a fluorescência FAM (azul), homozigoto (B).

2.4. Análise dos dados

A análise da diversidade genética entre variedades locais foi realizada em duas etapas: considerando o total de indivíduos pertencentes a uma única população e, posteriormente, em nível populacional, considerando os quatro municípios amostrados. Para análise da diversidade genética, com o auxílio do programa PowerMarker v.3.25 (Liu e Muse, 2005), foi estimada as frequências alélicas, número de alelos por *primer* (N_a), conteúdo da informação polimórfica (PIC) e heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, assumindo que os cruzamentos ocorrem aleatoriamente, portanto, não há endogamia,

seleção, migração, mutação ou deriva genética (KAGEYAMA et al., 2003), além do índice de fixação (f) e porcentagem de *primers* polimórficos (% P).

Para determinar a presença de alelos raros (AR) e alelos exclusivos (EA) foi utilizado o critério proposto por Cruz et al. (2011) onde, alelos raros foram considerados aqueles que expressaram frequência menor de 0,05% em cada população amostrada e o número de alelos exclusivos, contando os alelos presentes em apenas uma das populações (TIAGO et al., 2019).

A matriz de distância genética de Nei (1983) foi determinada entre as quatro populações amostradas e, posteriormente, importada para o programa MEGA 6.5 (KUMAR et al., 2004) para a construção do dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*). O programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) baseado na análise bayesiana foi usado para inferir o número de grupos (K). Para tanto foram realizadas 20 simulações independentes para cada número K (K com amplitude de 1 a 10, considerando o número de prováveis populações), com 500.000 interações de MCMC (Monte Carlo via Cadeias de Markov) após descarte inicial (burn-in) de 200.000, aplicando também os modelos de ancestralidade com mistura e de frequências alélicas correlacionadas. O número mais provável de agrupamentos foi estimado em relação ao proposto pelos critérios descritos por Pritchard et al. (2000) e Evanno et al. (2005) usando os arquivos de saída de STRUCTURE HARVEST (EARL; VONHOLDT, 2012) determinado pelo ΔK .

Também foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) e análise das Coordenadas Principais (PCoA), com auxílio do Software GenAlEx 6.501 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 12 *primers* microssatélites utilizados na genotipagem dos 48 indivíduos de *Manihot esculenta* amplificaram um total de 78 alelos, variando de 02 (SSRY40) a 11 (SSRY21) alelos por *primer*, com média de sete alelos por *primer* (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Pedri et al. (2019) e Tiago et al. (2019), utilizando 14 e 15 *primers* microssatélites (respectivamente) para caracterização molecular de variedades locais de mandioca no estado do Mato Grosso.

Tabela 3. Análise descritiva por *primer* microssatélite para 48 indivíduos de *Manihot esculenta*. Número de alelos (N_a); Heterozigosidade esperada (H_e); Heterozigosidade observada (H_o); Índice de fixação (F); Conteúdo de informação polimórfica (PIC)

<i>Primers</i>	N_a	H_e	H_o	F	PIC
GA131	5	0,65	0,79	-0,20	0,59
GA140	9	0,78	0,67	0,15	0,74
SSRY43	3	0,07	0,05	0,33	0,07
GA21	6	0,64	0,49	0,24	0,58
SSRY28	6	0,43	0,13	0,70	0,41
SSRY27	9	0,65	0,74	-0,13	0,61
GA12	7	0,69	0,85	-0,23	0,64
SSRY21	11	0,76	0,85	-0,11	0,73
SSRY35	10	0,84	0,94	-0,09	0,83
GA136	4	0,55	0,98	-0,78	0,45
SSRY40	2	0,44	0,64	-0,46	0,34
SSRY08	6	0,67	0,81	-0,20	0,61
Média	7	0,60	0,66	-0,07	0,55

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,07 (SSRY43) a 0,83 (SSRY35), com média de 0,55. De acordo com Botstein et al. (1980), o PIC pode variar de 0 a 1, indicando a qualidade do *primer* em relação à detecção de polimorfismo, sendo classificado como pouco informativo, quando apresenta valores menores que 0,25, mediantemente informativo, valores entre 0,25 a 0,50, e muito informativo, valores acima de 0,50. Dos 12 *primers* microssatélites utilizados neste estudo, oito foram muito informativos, três mediantemente informativos e apenas um foi pouco informativo, demonstrando a eficiência na detecção do polimorfismo dos *primers* utilizados (Tabela 3).

A H_e variou de 0,07 (SSRY43) a 0,84 (SSRY35) com média de 0,60 e a H_o variou de 0,05 (SSRY43) a 0,98 (GA136), com média de 0,66. A maioria dos *primers* microssatélites analisados apresentaram heterozigosidade observada maior que a esperada, com exceção do GA140, SSRY43, GA21 e SSRY28. Isso é um indicativo de uma predominância de heterozigotos entre os indivíduos de *M. esculenta* analisados, sendo corroborados com valores negativos de índice de fixação, que teve uma média de -0,07, sendo este um parâmetro para a avaliação do balanço entre homozigotos e heterozigotos nas populações (KAGEYAMA et al., 2003).

Estes altos níveis de heterozigosidade também podem ser um indicativo de que o fluxo gênico está desempenhando um importante papel na manutenção da diversidade genética de *M. esculenta* (MEZETTE et al., 2013), por meio das trocas de manivas entre os produtores promovendo a conservação *on farm* e ampliando a variabilidade genética da espécie, configurando um dos principais fatores que contribuem para o aumento da diversidade (FIGUEREDO et al., 2019; TIAGO et al., 2019). Costa et al. (2020) avaliando a diversidade genética de 106 acessos de mandioca que compõe a coleção localizada na Embrapa Acre, também encontraram altos níveis de heterozigosidade como neste estudo, porém, os valores da H_e foram maiores que H_o , na maioria dos *primers*, indicando um leve déficit de heterozigotos, o que não ocorreu neste estudo.

Os *primers* SSR utilizados neste estudo se mostraram altamente polimórficos, sendo observados um ou dois alelos com frequências maiores que as dos demais (Figura 6). O *primer* SSRY40 apresentou somente dois alelos (213 e 239) sendo o alelo 213 o de maior frequência (67,95%). Já o *primer* SSRY21 apresentou o maior número de alelos (11), sendo o alelo 182 o mais frequente (36,17%). Em geral as frequências alélicas variaram de 0,01 para os *primers* GA140 (alelo 184), SSRY43 (alelo 229), SSRY28 (alelo 180), SSRY27 (alelos 249, 261 e 303), GA12 (alelo 121), SSRY21 (alelo 186) e GA136 (alelo 127) a 0,97 para o *primer* SSRY43 (alelo 261).

Foram encontrados 15 alelos raros e 30 alelos exclusivos no total, com destaque para a população de Alvarães, que deteve 13 alelos raros e 22 alelos exclusivos. Já as populações Maraã e Tefé não apresentaram alelos raros, somente alelos exclusivos (4 e 2, respectivamente). A presença de alelos raros implica um fator

determinante para a conservação da diversidade genética, uma vez que, por apresentarem baixa frequência, estes alelos estão mais susceptíveis a serem perdidos por efeitos de deriva genética (MONTAGNA et al., 2012).

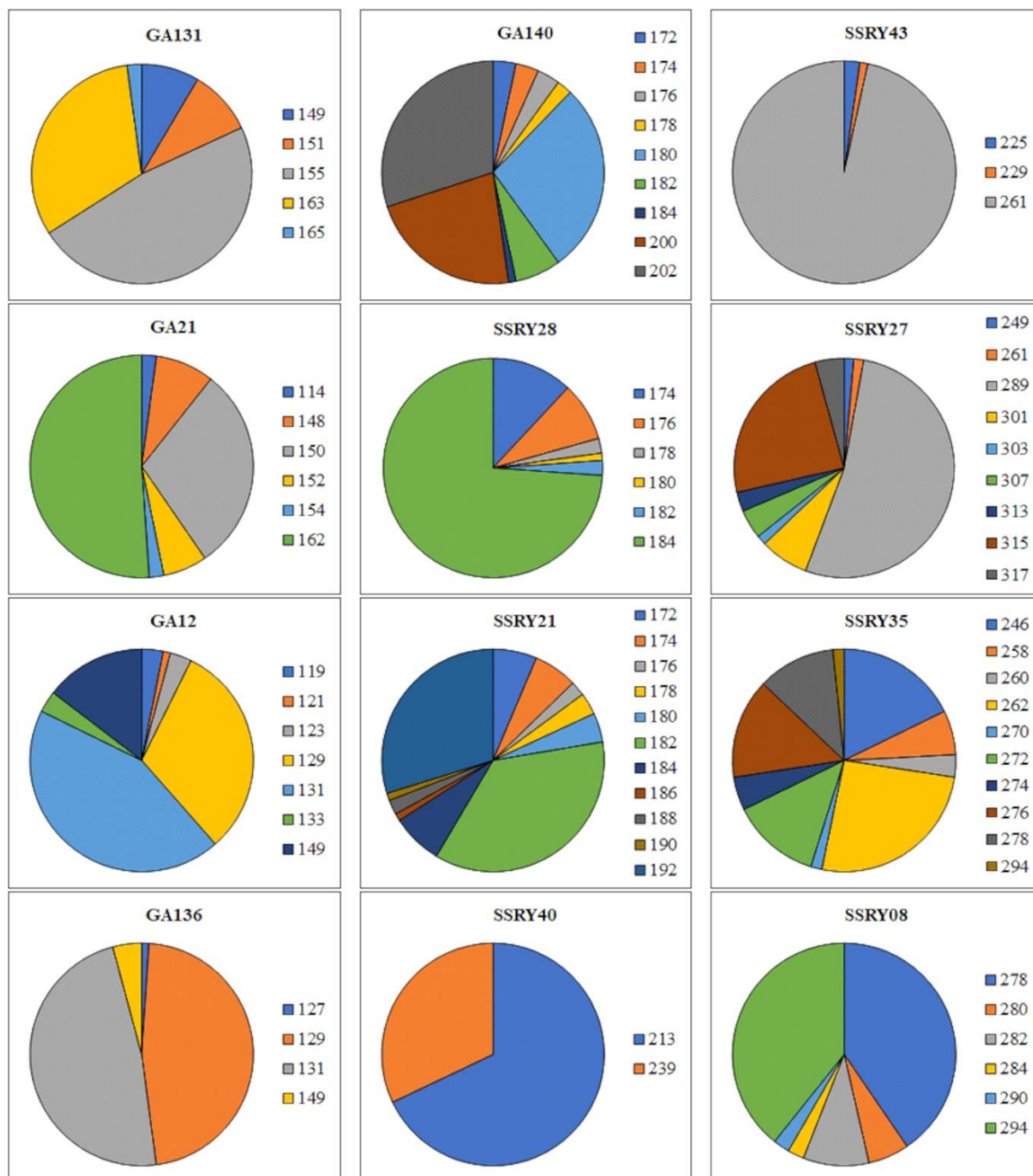


Figura 6. Representação das frequências alélicas dos 12 *primers* microsatélites utilizados para a caracterização molecular dos 48 indivíduos de *Manihot esculenta*.

Ao comparar a diversidade genética entre as quatro populações estudadas, verifica-se que a população de Alvarães apresentou maior número de alelos (44), com

média de 3,67 alelos por *primer*. Já a população de Maraã apresentou o menor número de alelos (29), com média de 2,42 alelos por *primer* (Tabela 4).

Tabela 4. Diversidade genética, utilizando os 12 *primers* SSR, por população de *Manihot esculenta*. Número de variedades locais amostradas (N) Número de alelos (N_a); Heterozigosidade esperada (H_e); Heterozigosidade observada (H_o); Índice de fixação (f); Conteúdo de informação polimórfica (PIC).

População	N	N_a	H_e	H_o	f	PIC
Uarini	13	35	0,51	0,70	-0,33	0,44
Alvarães	19	44	0,65	0,61	0,09	0,60
Maraã	7	29	0,51	0,69	-0,27	0,45
Tefé	9	31	0,46	0,67	-0,41	0,40
Média	12	35	0,53	0,67	-0,23	0,47

A heterozigosidade observada somente foi menor que a esperada para população de Alvarães. Para as demais populações estudadas a heterozigosidade observada foi maior que a esperada, gerando valores negativos do índice de fixação (Tabela 5), evidenciando a predominância de heterozigotos.

A distância genética de Nei foi calculada para inferir a divergência genética entre populações e apresentou valores de 0,0409 (Maraã e Tefé) a 0,0834 (Alvarães e Tefé). Estes valores da distância genética de Nei foram utilizados para a construção do dendrograma gerado pelo método UPGMA (Figura 7), separando as quatro populações em dois grupos genéticos sendo o grupo I composto somente pela população Alvarães, que se mostrou diferente das demais e o grupo II pelas outras três populações.

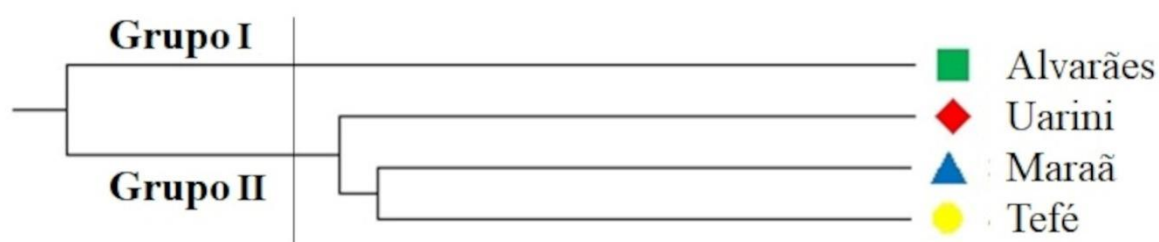


Figura 7. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (1983), em quatro populações de *Manihot. esculenta*.

O município de Alvarães - AM se encontra localizado entre Tefé - AM e Uarini - AM, cerca de 46 km de Uarini - AM e 18 km de Tefé - AM. Essa proximidade geográfica entre os municípios facilita a troca de manivas de variedades locais de mandioca, favorecendo a variabilidade genética dentro das populações. A população

de Alvarães apresentou maior número de alelos raros e exclusivos, tornando-a geneticamente distinta das demais populações. O fator geográfico não foi determinante nesse caso, uma vez que, o município de Maraã - AM é o mais isolado, cerca de 134 km do município mais próximo (Uarini - AM), todavia devido a circulação promovida pela APRU, com Tefé como polo regional, para saúde, educação, comércio entre outros fatores, favorece a interação entre os municípios (COTA, 2020).

A AMOVA revelou maior variação genética dentro das populações (93%) do que entre as populações (Tabela 5).

Tabela 5. Análise molecular de variância (AMOVA) das 48 variedades locais de mandioca cultivadas pelos produtores da cadeia produtiva de farinha Uarini. Grau de Liberdade (GL); Soma dos Quadrados (SQ); Componente de Variância (CV), Variância Total (VT), Diferenciação genética das populações (F_{ST}) e Probabilidades de significância (P)

Fonte de variação	GL	SQ	CV	VT (%)	F_{ST}	P
Interpopulacional	3	29.994	0.277	7	0.070	<0.001
Intrapopulacional	92	338.736	3.682	93		
Total	95	368.729	3.959	100		

A mandioca é uma espécie alógama, altamente heterozigótica, monóica, protogínica e diploide (FUKUDA, 1999). Todavia, ao longo dos anos tem sido cultivada, principalmente, por meio de propagação vegetativa, através da atividade de troca de manivas entre agricultores familiares que, normalmente, cultivam mais de duas variedades em suas roças (MARTINS; OLIVEIRA, 2009). Contudo, a reprodução sexual ainda se mantém ativa, o que promove o aumento da variabilidade genética (SILVA et al., 2001). Nesse sentido, por se tratar de uma espécie alógama e com maior propagação vegetativa, era esperado uma maior diversidade genética dentro das populações (FUKUDA et al., 2002; ORTIZ et al., 2016).

O valor de diferenciação genética das populações (F_{ST}) foi de 0,070 e foi significativo ($p < 0,001$), sendo considerada uma diferenciação moderada, seguindo a definição de Wright (1978), em que a diferenciação pode ser classificada como baixa ($0,00 \leq F_{ST} < 0,05$), moderada ($0,05 \leq F_{ST} < 0,15$), alta ($0,15 \leq F_{ST} < 0,25$) ou elevada ($F_{ST} > 0,25$). Esse F_{ST} de 7% pode ser explicado pela troca de material entre os agricultores. Segundo Martins e Oliveira (2009) a atividade de troca de manivas

entre agricultores familiares, que geralmente cultivam mais de duas variedades em suas roças, atuam como mantenedores da diversidade local.

Os 48 indivíduos de *M. esculenta* analisados foram divididos, pelo método UPGMA, em três grupos principais, independentemente da localidade de coleta (Figura 8). Isso pode ser decorrente da troca de manivas entre os agricultores associados, pois a propagação vegetativa de variedades locais de mandioca facilita a dispersão de genótipos bem como a troca de alelos (MARTINS; OLIVEIRA, 2009).

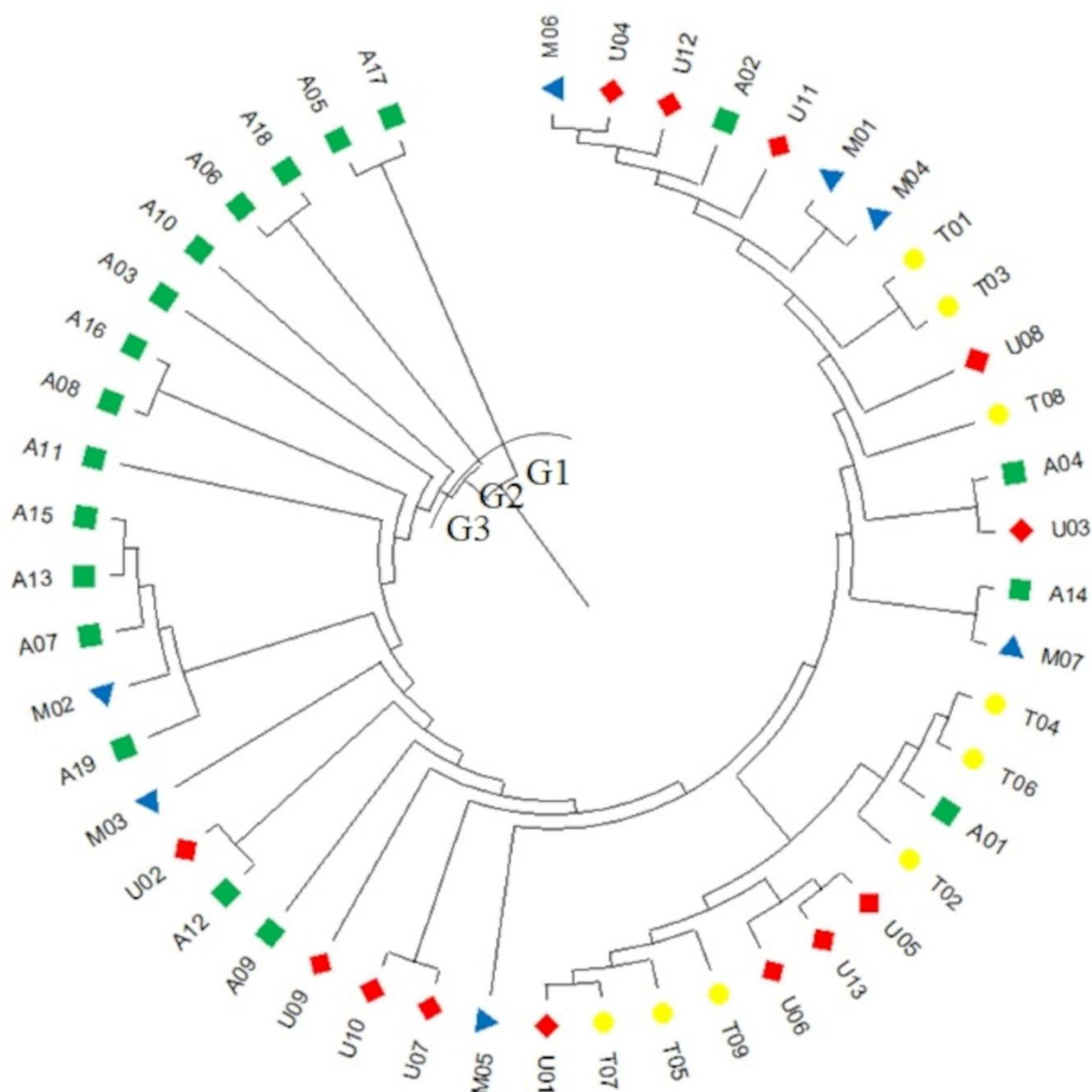


Figura 8. Agrupamento dos 48 indivíduos de *Manihot esculenta* obtido por meio do método UPGMA, com base na distância genética de Nei (1983). Uarini 01-13 (vermelho); Alvarães 01-19 (verde); Maraã 01-07 (azul); Tefé 01-09 (amarelo).

O grupo I e II constituíram-se de dois indivíduos da população Alvarães (A05 e A17; A06 e A18, respectivamente). Já o grupo III foi composto por 44 indivíduos distribuídos nas quatro populações. As variedades locais mais similares geneticamente, de acordo com a matriz de similaridade, foram U05 e U06 (0,31373), e as mais dissimilares foram U05 e U10 (0,02222). Apesar da maioria das variedades locais terem sido alocadas no grupo III, é possível observar a existência da variabilidade genética, uma vez que, é nítida a formação de subgrupos dentro deste grupo, e dependendo do corte utilizado, pode-se isolar outras variedades como A10, A03 e A11.

A análise bayesiana, assim como o resultado obtido pelo método UPGMA, formou três grupos genéticos distintos ($K=3$), representados por barras verticais nas cores vermelho, verde e azul (Figura 9). O grupo representado pela cor vermelha englobou nove indivíduos da população de Alvarães, presentes nos três grupos formados pelo dendrograma. Os indivíduos do G1 e G2 do UPGMA estão dentro desse grupo vermelho do Structure. O grupo representado pela cor verde, foi composto por 28 indivíduos distribuídos nas quatro populações estudadas, e agrupados no grupo III do dendrograma. O grupo representado pela cor azul foi formado por 11 indivíduos também distribuídos nas quatro localidades amostradas e agrupados no grupo III do dendrograma.

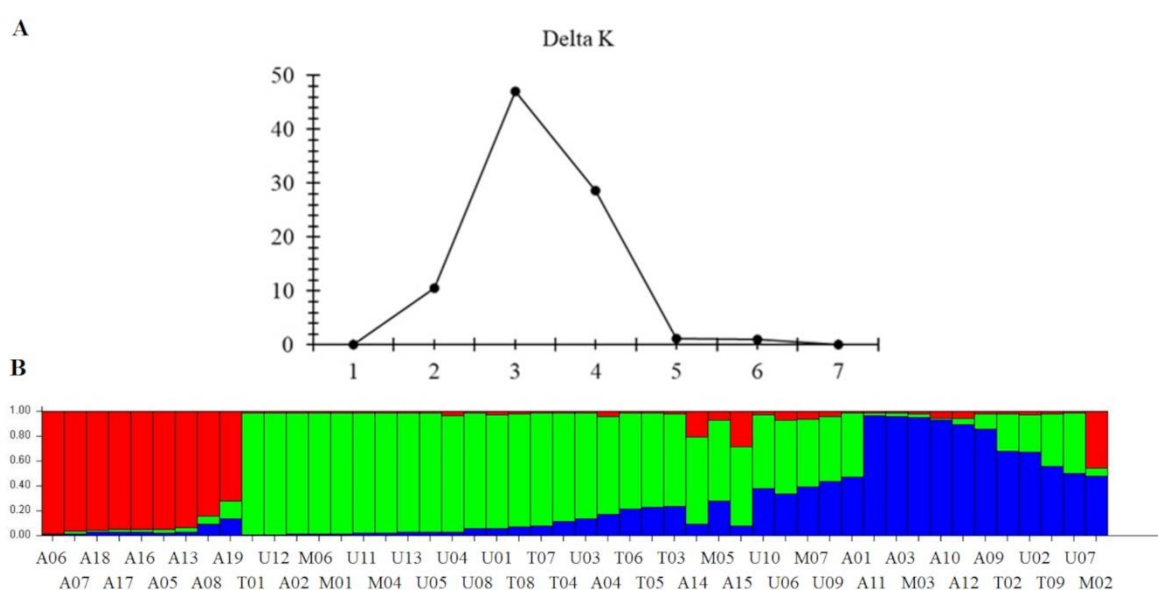


Figura 9. Análise bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE. Valores de ΔK evidenciando o melhor K com um pico maior em $k=3$ (A); Representação dos 48 indivíduos de quatro populações de

Manihot esculenta com base em 12 *primers* microssatélites. Uarini (U01-U13), Alvarães (A01-A19), Maraã (M01-M07) e Tefé (T01-109) (B).

O agrupamento Bayesiano não separou as quatro localidades analisadas, mas mostrou a formação de três grupos genéticos, sendo possível observar uma mistura de alelos entre os grupos, demonstrada pelo compartilhamento das cores, sendo observada pelo menos duas cores por indivíduo (Figura 9). Essa mistura de alelos também foi observada por Tiago et al. (2019), ao avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional de etnovariedades de mandioca cultivadas em propriedades familiares de seis municípios no estado de Mato Grosso.

Este compartilhamento de alelos possivelmente decorre do surgimento de recombinantes da reprodução sexuada e posterior incorporação desse material nas roças ou por meio da deriva genética pelo efeito fundador, ou seja, as roças teriam sido implantadas a partir de material heterozigoto e mantido via propagação vegetativa através das trocas de manivas (FARALDO et al., 2000). Esse fato também é corroborado por este estudo, uma vez que também apresentou uma heterozigotidade observada maior que a esperada.

A análise das duas coordenadas principais explicou 33,18% da variação total entre as amostras, sendo 24,68% para a primeira coordenada e 8,50% para a segunda (Figura 10). Assim como nos outros agrupamentos (UPGMA e análise bayesiana), não houve separação nítida entre os indivíduos das quatro populações, com exceção dos indivíduos A05, A06, A17 e A18 da população de Alvarães, devido, possivelmente a forma tradicional de dispersão dos genótipos através de redes de troca (EMPERAIRE; ELOY, 2008), principalmente entre os produtores pertencentes a Associação de Produtores de Farinha de Mandioca da Região de Uarini (APRU). Assim como no UPGMA, foi possível verificar a formação de subgrupos com composições similares, alocando, em sua maioria, as mesmas variedades locais.

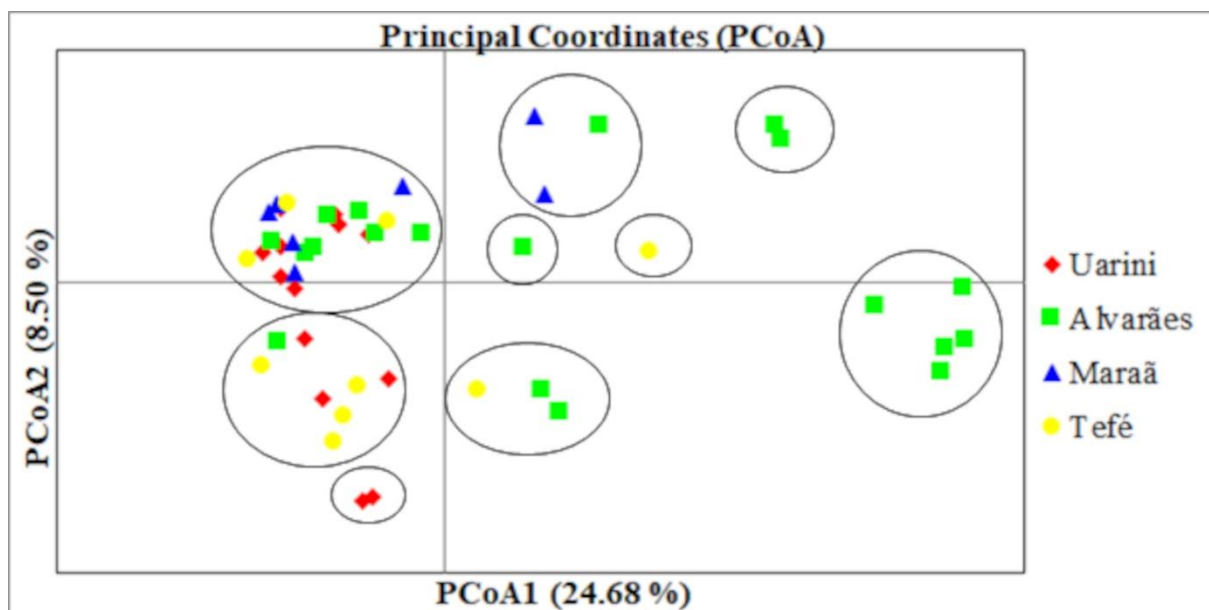


Figura 10. Análise das coordenadas principais dos 48 indivíduos de *Manihot esculenta* provenientes dos municípios de Uarini, Alvarães, Maraã e Tefé.

4. CONCLUSÕES

Há diversidade genética entre os 48 indivíduos de *Manihot esculenta* estudados, decorrente principalmente da base genética do material vegetal utilizado.

A diversidade genética foi maior dentro das populações do que entre as populações, devido sua alta reprodução vegetativa proveniente da atividade de trocas de manivas entre os produtores, enfatizando a importância da conservação *on farm* para a espécie.

A divergência genética entre as variedades locais de mandioca representa um fator importante para a preservação da espécie, além de um potencial a ser explorado em programas de conservação e reprodução em cultivos da espécie, ou até mesmo em programas de melhoramento.

A população de Alvarães apresentou maior número de alelos raros e alelos exclusivos, podendo estar relacionado com a riqueza genética da população, na qual deve ser conservada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARACATY, M. L.; SOARES, M. A. A importância da farinha de mandioca para a agricultura familiar e para o desenvolvimento regional local. **Studies In Social Sciences Review**, v. 4, n. 1, p. 25-55, 2023.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2016. 385p.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.
- CEBALLOS, H.; CRUZ, G.A. Taxonomía y morfología de la yuca. In: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (Coord.). **La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización**. Cali: CIAT, 2002. p. 16-32.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; FREGENE, M. A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 493-501, 1998.
- COSTA, N. A.; AZÊVEDO, H. D. S.; SILVA, L. M.; CUNHA, E. F. M.; SIVIERO, A.; CAMPOS, T. D. Molecular characterization and core collection evaluation of *Manihot esculenta* Crantz. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 1, p. 22-35, 2020.
- COTA, W. Monitoring the number of COVID-19 cases and deaths in Brazil at municipal and federative units' level. **SciELO Preprints**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2020.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12: 13-15, 1990.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, v. 4, n. 1, p. 359-361, 2012.
- EMPERAIRE, L.; ELOY, L. A cidade, um foco de diversidade agrícola no Rio Negro (Amazonas, Brasil). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 3, n. 2, p. 195-211, 2008.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

FARALDO, M. I. F.; SILVA, R. M. D.; ANDO, A.; MARTINS, P. S. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 499-505, 2000.

FIGUEREDO, P. E.; TIAGO, A. V.; ZANETTI, G. T.; PINTO, J. M. A.; ROSSI, A. A. B.; HOOGERHEIDE, E. S. S. Diversidade genética de mandiocas na região periurbana de Sinop, Mato Grosso, Brasil. **Magistra**, v. 30, p. 143-153, 2019.

FUKUDA, W. M. G. **Melhoramento de mandioca**. In: BÓREM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 1999. 969 p.

FUKUDA, W. M. G.; CAVALCANTI, J.; FUKUDA, C.; COSTA, I. R. S. Variabilidade genética e melhoramento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. 2005.

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. **Melhoramento de mandioca no Brasil**. In: CEREDA, M. P. (Ed.) Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 540 p.

GALERA, J. M. S. V.; VALLE, T. L. Estruturação genética do germoplasma de mandioca através de informação comparativas entre estudos biológicos e antropológicos – resultados preliminares. **Revista raízes e amidos Tropicais**, v. 3, n. 1, p. 363-366, 2007.

IDAM, Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas. **Cartilha: Como Cultivar Mandioca**. Manaus, AM: 2019. p. 4.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **IBGE**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93-107, 2003.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

LIU, K.; MUSE, S. V. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2128-2129, 2005.

LOBO, L. D.; SANTOS JÚNIOR, C. F.; NUNES, A. Importância socioeconômica da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para a comunidade de Jaçapetuba, município de Cametá, PA. **Multitemas**, v. 23, n. 55, p. 195-211, set./dez. 2018.

MARTINS, M. L. L.; ORLANDINI, P.; MENDOZA F., J. M.; SILVEIRA, T. C. *Manihot* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB17600>>. Acesso em: 16 jan. 2023.

MARTINS, P. S.; OLIVEIRA, G. C. X. **Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos**. In: VIEIRA, I. C. G.; SILVA, J. M. C.; OREN, D. C.; D'INCAO, M. A. Diversidade biológica e cultural da Amazônia. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2009. 373-391p. MOBOT. Euphorbiaceae.

MBA, R. E. C.; STEPHENSON, P.; EDWARDS, K.; MELZER, S.; NKUMBIRA, J.; GULLBERG, U.; APEL, K.; GALE, M.; TOHME, J.; FREGENE, M. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 21-31, 2001.

MEZETTE, T. F.; BLUMER, C. G.; VEASEY, E. A. Morphological and molecular diversity among cassava genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 510-518, 2013.

MONTAGNA, T.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; FERNANDES, C. D.; BITTENCOURT, R.; DA SILVA, J. Z.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. A. Importância das unidades de conservação na manutenção da diversidade genética de xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no Estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira-Bio Brasil**, n. 2, p. 26-32, 2012.

ORTIZ, A. H. T.; ROCHA, V. P. C.; MOIANA, L. D.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C., GALVÁN, M. Z.; VIDIGAL FILHO, P. S. Population structure and genetic diversity in sweet cassava cultivars from Paraná, Brazil. **Plant molecular biology reporter**, v. 34, n. 6, p. 1153-1166, 2016.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research; an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PEDRI, E. C. M.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; TIAGO, A. V.; CARDOSO, E. D. S.; PINTO, J. M. A.; SANTOS, L. L.; ROSSI, A. A. B. Genetic diversity of cassava landraces cultivated in northern Mato Grosso State, Brazil, using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 3, 2019.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

SCHOR, T.; TAVARES-PINTO, M. A.; AVELINO, F. C. C.; RIBEIRO, M. L. Do peixe com farinha à macarronada com frango: uma análise das transformações na rede urbana no Alto Solimões pela perspectiva dos padrões alimentares. **Revista Franco-Brasileira de Geografia**, n. 24, 2015.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SENA, R. R. **Sistema de produção em casas de farinha: uma contribuição ao processo de consolidação da indicação geográfica da farinha Uarini**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2019. 233p. (Tese – Doutorado em Administração).

SILVA, J. R.; SANTOS, J. P. G.; VIANA, F. M. F.; OLER, J. R. L.; STEWARD, A. M. Impactos da COVID-19 nas cadeias produtivas e no cotidiano de comunidades tradicionais na Amazônia Central. **Mundo Amazônico**, v. 11, n. 2, p. 75-92, 2020.

SILVA, R. M. D.; BANDEL, G.; FARALDO, M. I. F.; MARTINS, P. S. Biologia reprodutiva de etnovariedades de mandioca. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 101-107, 2001.

SOUZA, D.C.L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

TIAGO, A. V.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; PEDRI, E. C. M.; ROSSI, F. S.; CARDOSO, E. S.; J. M. A.; PENA, G. F.; ROSSI, A. A. B. Genetic diversity and population structure of cassava ethno-varieties grown in six municipalities in the state of Mato Grosso, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 4, p. 1-17, 2019.

TIAGO, A. V.; ROSSI, A. A. B.; TIAGO, P. V.; CARPEJANI, A. A.; SILVA, B. M.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; YAMASHITA, O. M. Genetic diversity in cassava landraces grown on farms in Alta Floresta-MT, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n. 3, p. 1-10, 2016.

VIEIRA, M. L. C.; SANTINI, L.; DINIZ, A. L.; MUNHOZ, C. D. F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and molecular biology**, v. 39, p. 312-328, 2016.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. University of Chicago Press: Chicago, 1978.

4.2 CAPÍTULO II

Diversidade genética de variedades locais de mandioca da cadeia produtiva de farinha Uarini por meio de marcadores moleculares ISSR

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Manihot esculenta* Crantz pertence à família Euphorbiaceae Juss. e possui ampla distribuição por todo Brasil, com ocorrência confirmada em todas as regiões brasileiras, apesar de não ser endêmica do país (MARTINS et al., 2023). O seu cultivo contribui na geração de emprego e renda, além de ser extremamente vantajoso devido seu alto aproveitamento, sendo utilizadas desde as folhas e caules até as raízes (EMBRAPA, 2003; BERNARDO et al., 2016; MACEDO, 2016). O estado do Amazonas é o segundo maior produtor de mandioca da região Norte, tendo boa parte da produção regionalmente beneficiada em casas de farinha (IDAM, 2019).

Dentre as cadeias produtivas de farinha no estado do Amazonas, a farinha Uarini se destaca, principalmente pela obtenção da concessão da Indicação Geográfica (IG), devidamente publicada pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, na Revista de Propriedade Intelectual, em 27 de agosto de 2019 (INPI, 2019). O selo de IG garante maior valorização desses produtos de cunho cultural e regional, compreendendo um processo formal de reconhecimento de produtos com características distintivas associadas a um território, conferindo um registro específico ao coletivo de produtores envolvidos (BRANCO et al., 2012).

A IG Uarini compreende os municípios de Uarini, Alvarães, Tefé e Marã, localizados no estado do Amazonas, sendo que, o cultivo de mandioca e a produção da farinha nessa região estão fortemente presentes há muito tempo. A cadeia produtiva da farinha de mandioca é um importante recurso socioeconômico para o Estado do Amazonas, por fornecer um componente fundamental para dieta do cidadão amazonense, principalmente, às classes menos favorecidas (DIAS et al., 1999), onde a base da alimentação é por vezes peixe com farinha (SCHOR et al., 2015).

A mandioca apresenta ampla variabilidade genética (GALERA; VALLE, 2007) devido, principalmente, ao trabalho realizado pelos agricultores familiares, que ao desenvolver atividades como troca de manivas entre si, vem atuando como mantenedores da diversidade local (MARTINS; OLIVEIRA, 2009). Além disso, essa variabilidade genética também pode ser resultado da seleção natural, do processo de domesticação da espécie cultivada, da predisposição para polinização cruzada, dos

altos níveis de heterozigosidade e da deiscência dos frutos que conseguem ser preservados em bancos de sementes e são capazes de germinar após o processo de derrubada e queimada para a instalação da nova lavoura (FUKUDA; SILVA, 2002).

Diante da importância da espécie é indispensável buscar formas de caracterização e avaliação da diversidade genética visando melhores métodos de conservação. Para isso, pode ser empregado o uso de marcadores moleculares, ferramentas utilizadas para o gerenciamento de recursos genéticos, caracterização e avaliação da diversidade genética entre e dentro das espécies, apresentando alta eficiência para os programas de melhoramento genético (MATSUMURA et al., 2015). Dentre os marcadores moleculares utilizados, estão os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), que apresentam caráter dominante, baixo custo, alto índice de polimorfismo e alta reprodutibilidade (CHEN et al., 2017).

Diante disso, este estudo objetivou caracterizar a diversidade genética de variedades locais de mandioca da cadeia produtiva de farinha Uarini por meio de marcadores moleculares ISSR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e amostragem

As coletas do material vegetal foram realizadas na área determinada pela Identificação Geográfica (IG) Uarini, que compreende os municípios de Uarini, Alvarães, Tefé e Marã, localizados do estado do Amazonas.

Foram coletadas duas folhas jovens e totalmente expandidas de 13 variedades locais de mandioca mais frequentes nos cultivos dos agricultores no município de Uarini, 13 no município de Alvarães, 6 no município de Marã e 9 no município de Tefé, perfazendo um total de 41 variedades locais.

O material vegetal coletado foi identificado em campo com código (Tabela 1), e acondicionado em saco plástico com fecho hermético juntamente com sílica gel. Posteriormente foram despachados via Sedex para a Universidade do Estado do Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), campus de Alta Floresta, nas dependências do Centro de Pesquisa e Tecnologia da Amazônia Meridional (CEPTAM), Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol). Ao chegar no GenBioMol as amostras foram retiradas da sílica e acondicionadas em saquinhos de alumínio devidamente identificados, e armazenadas em freezer a aproximadamente -20 C°, para posteriormente ser realizada a extração de DNA.

Tabela 1. Número e código atribuídos a coleta de cada variedade local de mandioca coletada nos respectivos municípios

Número	Código	Nome da variedade local	Município
1	U01	<i>Baixotinha</i>	Uarini
2	U02	<i>Achada preta</i>	Uarini
3	U03	<i>Manivão</i>	Uarini
4	U04	<i>Catombo Normal</i>	Uarini
5	U05	<i>Antinha</i>	Uarini
6	U06	<i>Antinha Preta</i>	Uarini
7	U07	<i>Antinha Branca</i>	Uarini
8	U08	<i>Catombo Normal</i>	Uarini
9	U09	<i>Vermelhinha</i>	Uarini
10	U10	<i>Antinha Branca</i>	Uarini
11	U11	<i>Catombo Normal</i>	Uarini
12	U12	<i>Catombo Direita</i>	Uarini
13	U13	<i>Antinha</i>	Uarini

Tabela 1, Cont...

14	A01	<i>Baixotinha</i>	Alvarães
15	A02	<i>Catombo</i>	Alvarães
16	A03	<i>Manteguinha</i>	Alvarães
17	A04	<i>Baixotinha</i>	Alvarães
18	A07	<i>Sacaí</i>	Alvarães
19	A09	<i>Pretinha</i>	Alvarães
20	A10	<i>Italiana</i>	Alvarães
21	A11	<i>Macaxeira branca</i>	Alvarães
22	A12	<i>Samauma</i>	Alvarães
23	A14	<i>João Gonçalo</i>	Alvarães
24	A15	<i>Catombo</i>	Alvarães
25	A18	<i>Catombinho</i>	Alvarães
26	A19	<i>Catombo</i>	Alvarães
27	M01	<i>Catombo</i>	Maraã
28	M02	<i>Angelina</i>	Maraã
29	M03	<i>Catombinho</i>	Maraã
30	M04	<i>Baixotinha</i>	Maraã
31	M06	<i>Catombo</i>	Maraã
32	M07	<i>Angelina</i>	Maraã
33	T01	<i>João Gonçalo</i>	Tefé
34	T02	<i>7 anos</i>	Tefé
35	T03	<i>Samauma</i>	Tefé
36	T04	<i>Catombo</i>	Tefé
37	T05	<i>Catombo</i>	Tefé
38	T06	<i>Catombinho</i>	Tefé
39	T07	<i>Baixotinha</i>	Tefé
40	T08	<i>Catombo</i>	Tefé
41	T09	<i>João Gonçalo</i>	Tefé

2.2. Extração do DNA

O DNA genômico total foi extraído de, aproximadamente, 100 mg do material foliar seguindo o método Cetil Trimetil Amônio (CTAB) descrito por Doyle & Doyle (1990) com modificações realizadas por Tiago et al. (2016), para a espécie: aumento da concentração de polivinilpirrolidona (PVP) de 1% para 2% e de β -mercaptoetanol de 0,2% para 1,8% no tampão de extração; adição de 0,4% de proteinase K no tampão de extração; redução do tempo de incubação a 65 °C de 60' para 30'.

O DNA extraído foi submetido ao micro espectrofotômetro NANO-300 e a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 μ g/mL) e

comparado com marcador de DNA λ de 100 ng/ μ L, para verificar sua concentração e qualidade e posteriormente serem feitas as diluições das amostras em água destilada autoclavada para uma concentração de aproximadamente 100 ng/ μ L para uso nas amplificações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.3. Caracterização molecular e amplificação via PCR

Para a caracterização da divergência genética foram utilizados sete primers ISSR (TRI GTG; UBC 807; UBC 808; UBC 834; UBC 856; UBC 868; UBC 891) desenvolvidos pela *University of British Columbia*, de 15-18 nucleotídeos de comprimento para a amplificação do DNA via PCR.

As reações de amplificações via PCR foram realizadas em um volume final 10 μ L, contendo: 1,3 μ L de H₂O, 2 μ L de DNA (100 ng), 1 μ L de tampão 10x (1M KCl; 1M Tris pH 8.3; 10% Tween 20), 1,6 μ L de MgCl₂ (25 mM), 2 μ L de dNTPs (1 mM), 0,5 μ L de DMSO, 1,5 μ L de primer (0,2 mM), e 0,2 μ L de Taq polimerase (5U/ μ L).

O programa de amplificação foi o descrito por Silva et al. (2011), com uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 4 min, seguidas de 35 ciclos nas seguintes condições: 30 segundos para desnaturação a 94°C; 35 segundos para anelamento a 47 – 58,9°C (variando de acordo com o *primer* utilizado) e 2 minutos para extensão a 72°C. A extensão final foi de 72°C por sete minutos.

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em cuba horizontal, com tampão TBE 1 x, com voltagem constante de 80 V por, aproximadamente, quatro horas. Após a corrida eletroforética os géis foram corados em recipiente com solução de brometo de etídeo (0,6 μ g/mL⁻¹), por 20 minutos. Em seguida, visualizados em transiluminador UVB LTB-21x26 (Loccus Biotecnologia®) e fotodocumentados, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados comparados com o marcador molecular KAPA Universal de 100pb.

2.4. Análise dos dados

Os fragmentos amplificados foram convertidos em uma matriz binária: presença (1) ou ausência (0) de bandas. A matriz binária foi utilizada para calcular o percentual de polimorfismo de cada primer, por meio da equação 1:

Equação 1:

$$\text{Porcentagem de polimorfismo} = \frac{\text{número de bandas polimórficas}}{\text{número total de bandas}} \times 100$$

Para determinar o poder discriminatório de cada primer calculou-se o conteúdo de informação polimórfica (PIC), proposto por Anderson et al. (1993). Os valores de PIC para cada marcador foram determinados pela equação 2:

Equação 2:

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Onde P_{ij} é a frequência do alelo "j" no marcador "i" (a soma se estende por todos os alelos).

O cálculo foi baseado no número de alelos detectados por marcador para um determinado loco e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos genótipos analisados. O valor do PIC varia de "0", para perfis monomórficos, até "1", para perfis altamente polimórficos.

A dissimilaridade entre as variedades locais de mandioca foi realizada por meio da matriz binária, convertida em uma matriz de dissimilaridade genética, utilizando o índice de Jaccard através do complemento aritmético. Esse coeficiente consiste na comparação do número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas (MEYER, 2002) por meio da equação 3:

Equação 3:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

Onde:

$$S_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$$

Sendo, a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos; b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i, e, c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j.

A partir da matriz de dissimilaridade, obtida pelo índice de Jaccard, foram realizadas análises de agrupamento das variedades locais por meio do método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*). Também se calculou o coeficiente de correlação cofenética (CCC), estresse, distorção e ponto de corte de acordo com Mojena (1977), além de estimar o número ótimo de marcadores. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GENES versão 2018.23 (CRUZ, 2016).

O programa “Structure” versão 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), baseado no modelo de agrupamento Bayesiano, foi utilizado para inferir número de grupos (K), usando Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Para determinar o melhor K encontrado na população, utilizou-se do arquivo de saída do “Structure” baseado no STRUCTURE HARVEST (EARL et al., 2012) determinado pelo ΔK . Com os dados particionados em dois grupos (K=2), conforme obtido pelo programa Structure, foi possível revelar a distribuição da diversidade genética dentro do grupo de etnovariedades de mandioca estudadas.

Também foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) com auxílio do Software GenAlEx 6.501 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sete primers amplificaram um total de 82 fragmentos, sendo 51 polimórficos (Tabela 2), demonstrando a existência de diversidade genética entre as 41 variedades locais de mandioca cultivadas na região da Indicação Geográfica Uarini. O número total de fragmentos (NTF) por primer variou de sete (UBC 807 e UBC 808) a 19 (UBC 891), com média de 11,71 por primer. Já o número de fragmentos polimórficos (NFP) variou de cinco (UBC 807 e UBC 808) a 14 (TRI GTG).

Tabela 2. Número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP), porcentagem de polimorfismo (%P) e índice de conteúdo polimórfico (PIC) para os sete primers ISSR em relação as 41 variedades locais de mandioca coletadas na Indicação Geográfica Uarini, estado do Amazonas, Brasil

Primer	Sequência do iniciador (5'----3')	NTF	NFP	%P	PIC
TRI GTG	GTGGTGGTGGTGGTG	15	14	93,33	0,60
UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	7	5	71,43	0,43
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	7	5	71,43	0,22
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT*	13	6	46,15	0,21
UBC 856	ACACACACACACACACYA*	12	7	58,33	0,28
UBC 868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	9	6	66,67	0,24
UBC 891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	19	8	42,11	0,23
Média	-	11,71	7,29	62,20	0,32
Total	-	82	51	62,20	-

*Y = C ou T; V = A, C ou G; H = A, C ou T.

O polimorfismo pode ser observado no perfil eletroforético de 13 variedades locais de mandioca com o primer UBC 807 (Figura 1), onde foram observados sete fragmentos, sendo quatro deles polimórficos.

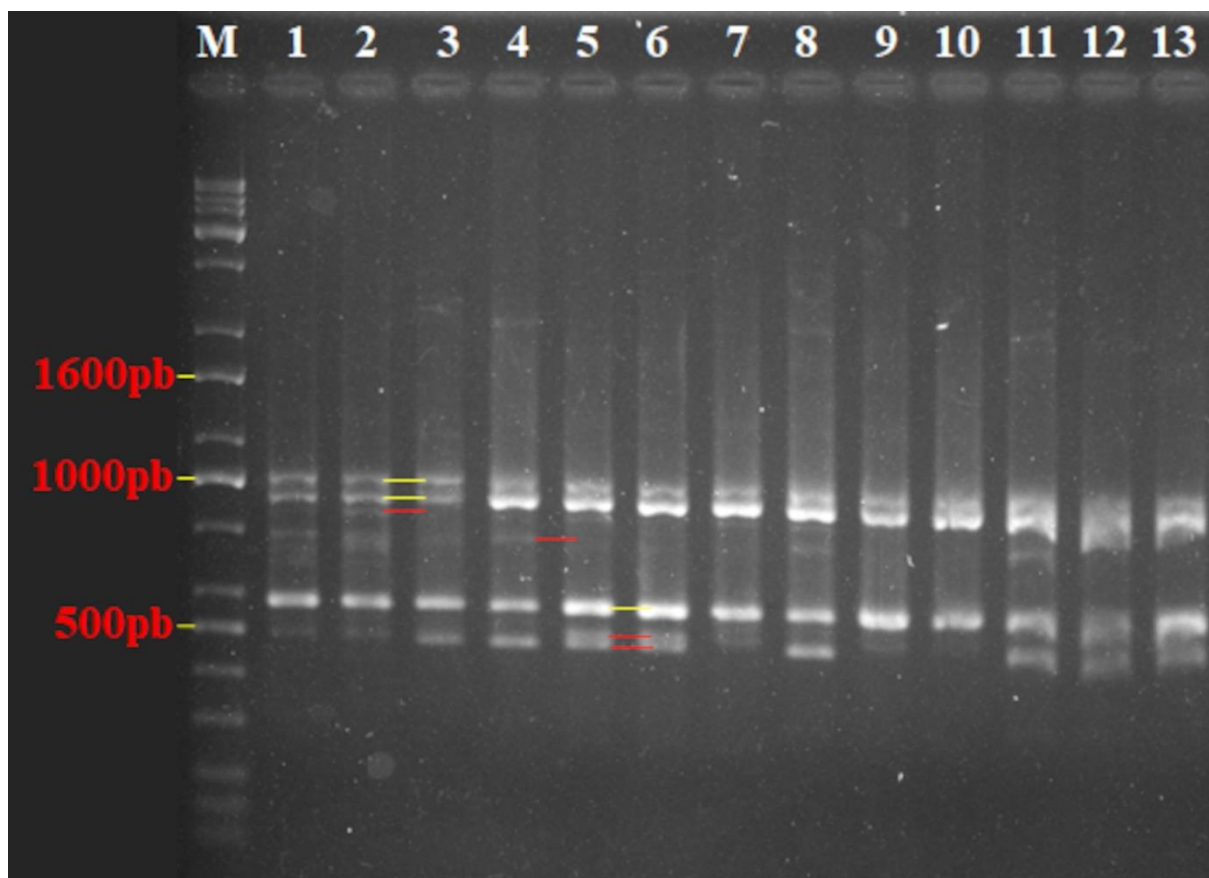


Figura 1. Produtos de amplificação do DNA genômico de 13 variedades locais (população de Uarini 1-13) de mandioca com o primer UBC 807. M: marcador 100 pb. Linhas vermelhas indica os fragmentos polimórficos. Linhas amarelas indica fragmentos monomórficos.

A porcentagem média de polimorfismo foi de 62,20%, corroborando com Wolf et al. (2022) e Cuchi et al. (2022), que por meio de marcadores moleculares ISSR, obtiveram 67,92% e 60,13% de polimorfismo (respectivamente). Além disso, o número de polimorfismo observado também pode ser decorrente da particularidade genética de cada variedade local em estudo, assim como do número de indivíduos avaliados (SILVA et al., 2018).

O PIC, para os sete primers ISSR utilizados, variou de 0,21 (UBC 834) a 0,60 (TRI GTG), com média de 0,32, sendo considerados mediantemente informativos (BOTSTEIN et al., 1980), sendo, portanto, indicados para estudos futuros com a espécie. Cuchi et al. (2022) em seus estudos também encontraram resultados semelhantes, com valores médios de PIC de 0,33, sendo considerados mediantemente informativos. Já Figueredo et al. (2019), avaliando as variedades locais de mandiocas mantidas por agricultores da região periurbana do município de Sinop, Mato Grosso,

utilizando os marcadores moleculares ISSR, obtiveram uma média de 0,52 para o PIC, sendo considerados muito informativos.

A análise molecular de variância revelou maior variação genética dentro das populações (60%) do que entre as populações (Tabela 3) confirmando os resultados obtidos pelo capítulo I dessa dissertação, que foi de 93% da variação intrapopulacional. Esses resultados corroboram com estudos realizados por Fukuda et al. (2002) e Ortiz et al. (2016), que relatam ser esperado uma maior diversidade genética dentro das populações do que entre as populações, por se tratar de uma espécie alógama e com maior propagação vegetativa. Essa propagação vegetativa é proveniente da atividade de trocas de manivas entre os produtores (MARTINS; OLIVEIRA, 2009; OLER, 2017; PEDRI et al., 2021), envolvidos na cadeia produtiva da farinha Uarini.

Tabela 3. Análise molecular de variância (AMOVA) das 41 variedades locais de mandioca cultivadas pelos produtores da cadeia produtiva de farinha Uarini. Grau de Liberdade (GL); Soma dos Quadrados (SQ); Componente de Variância (CV), Variância Total (VT), Índice de fixação entre populações (F_{ST}) e Probabilidades de significância (P)

Fonte de variação	GL	SQ	CV	VT (%)	F_{ST}	P
Interpopulacional	3	208,263	6,052	40	0,399	<0.001
Intrapopulacional	37	336,688	9,100	60		
Total	40	544,951	15,151	100		

O valor de diferenciação genética das populações (F_{ST}) obtido neste estudo foi de 0,399, significativo ($p < 0,001$), sendo considerada uma diferenciação elevada de acordo com a definição de Wright (1978). Este valor de F_{ST} também representa um índice de diferenciação genética da população determinando qual a proporção da variabilidade genética total é devido a diferenças genéticas entre populações e qual proporção é devido a diferenças entre indivíduos (MORK, 2000). Neste estudo, observou-se que 40% da variabilidade genética total é devido a diferenças genéticas entre as variedades locais analisadas.

Levando em consideração o trabalho fundamental dos agricultores associados para a manutenção dessa diversidade genética interpopulacional, além da importância acadêmica, este estudo pode trazer uma contribuição para o desenvolvimento

econômico da cadeia produtiva da farinha Uarini, uma vez que, serve como base para novos estudos na região e faz com que os agricultores se apropriem e entendam melhor a sua importância na manutenção dessa diversidade.

O número ótimo de bandas para se estimar confiavelmente a diversidade genética para as 41 variedades locais de mandioca neste estudo foi de 57 bandas. A partir desse número a correlação atingiu o valor de 0,9625 (Figura 2A) e valor de estresse atingiu 0,0511 (Figura 2B), sendo um indicativo de que as estimativas são de alta precisão (KRUSKAL, 1964), uma vez que, o número total de bandas obtidas neste estudo foi 82, bem acima do estabelecido como número ótimo de bandas, que foi 57.

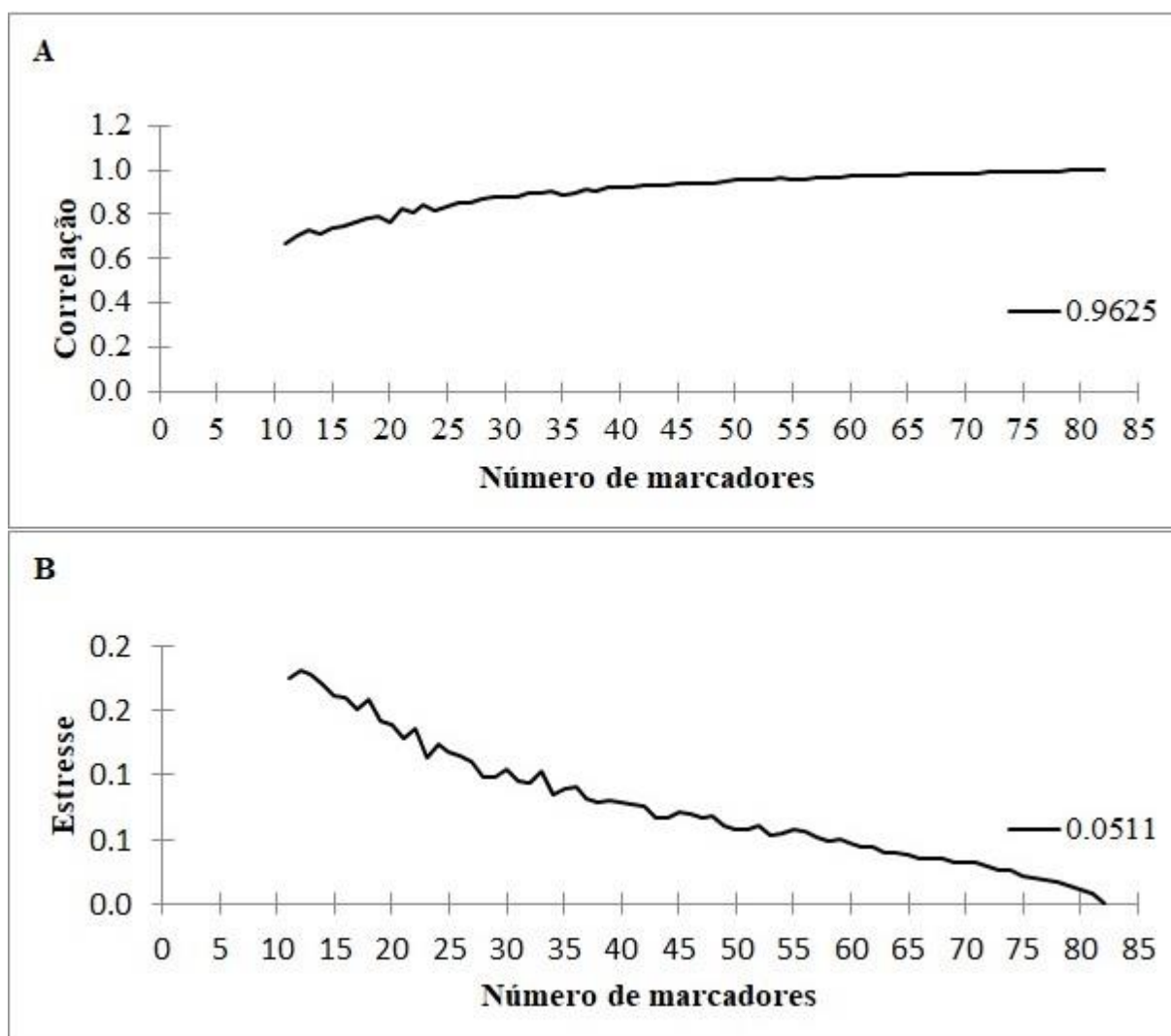


Figura 2. Estimativas das correlações entre as similaridades genéticas para números crescentes de *primers* ISSR polimórficos (A) e valores de estresse, que indicam o número mínimo ideal de fragmentos (57 fragmentos) para as análises genéticas das 41 variedades locais de mandioca (B).

A dissimilaridade genética entre as 41 variedades locais de mandioca avaliadas neste estudo apresentou valores entre 0,02273 a 0,35135, sendo que as

variedades locais mais similares geneticamente foram a A14 (*João Gonçalo*) e a A15 (*Catombo*), enquanto as mais dissimilares foram a U02 (*Achada preta*) e a U07 (*Antinha Branca*).

O método de agrupamento UPGMA, com ponto de corte de 76%, formou cinco grupos (Figura 3), sendo o Grupo 1 composto por 34 variedades locais de mandioca, incluindo as duas mais similares, o Grupo 2 composto por duas variedades locais (U05 *Antinha* e U06 *Antinha Preta*), o Grupo 3 composto por três variedades (U07 *Antinha Branca*; A10 *Italiana* e U09 *Vermelhinha*), e os Grupos 4 e 5, compostos por apenas uma variedade local cada (U10 *Antinha Branca* e U02 *Achada preta*, respectivamente).

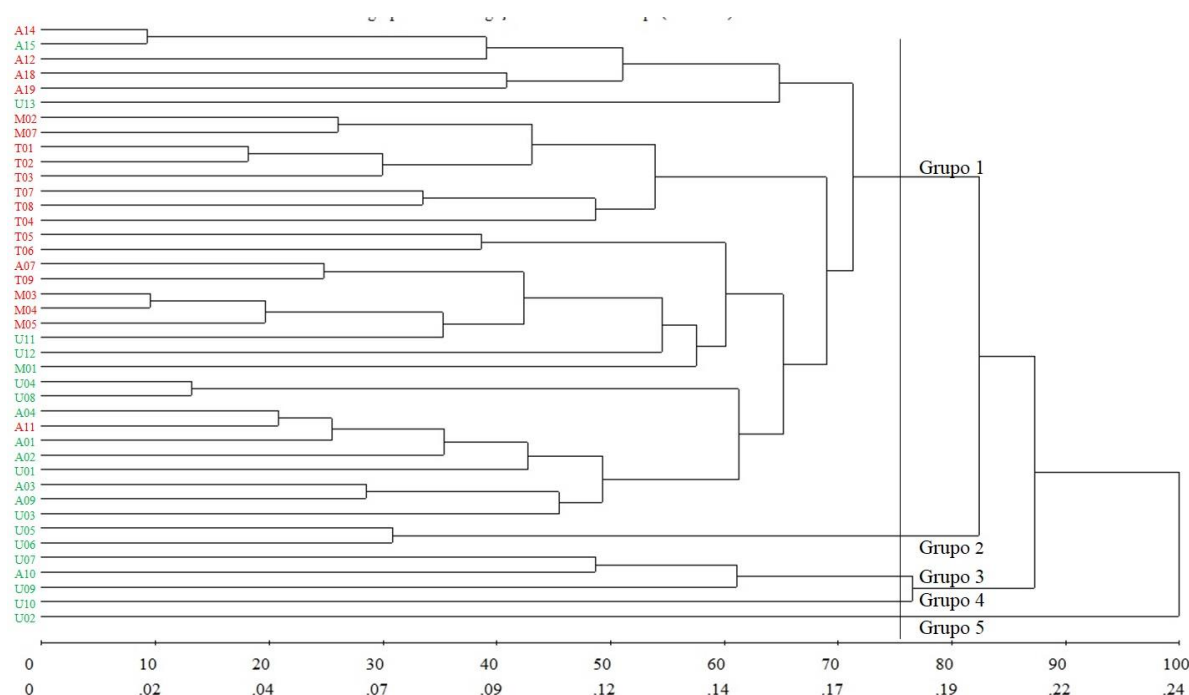


Figura 3. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento Ligação Média Entre Grupo (UPGMA) e complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, em 41 variedades locais de mandioca com base em sete marcadores moleculares ISSR.

Nesse estudo, a correlação cofenética (CCC) foi de 58%, com porcentagem de distorção (7,11%) e de estresse (26,66%). Segundo Cruz e Carneiro (2003) quanto maior o valor de CCC, melhor é o ajuste da matriz de dissimilaridade e a representação gráfica das distâncias, sendo que, um CCC acima de 70% é considerado bom para indicar a confiabilidade do agrupamento gerado pelo método.

A análise bayesiana, obtida pelo programa Structure, dividiu as 41 variedades locais de mandioca em dois grupos genéticos ($k = 2$) conforme a Figura 4.

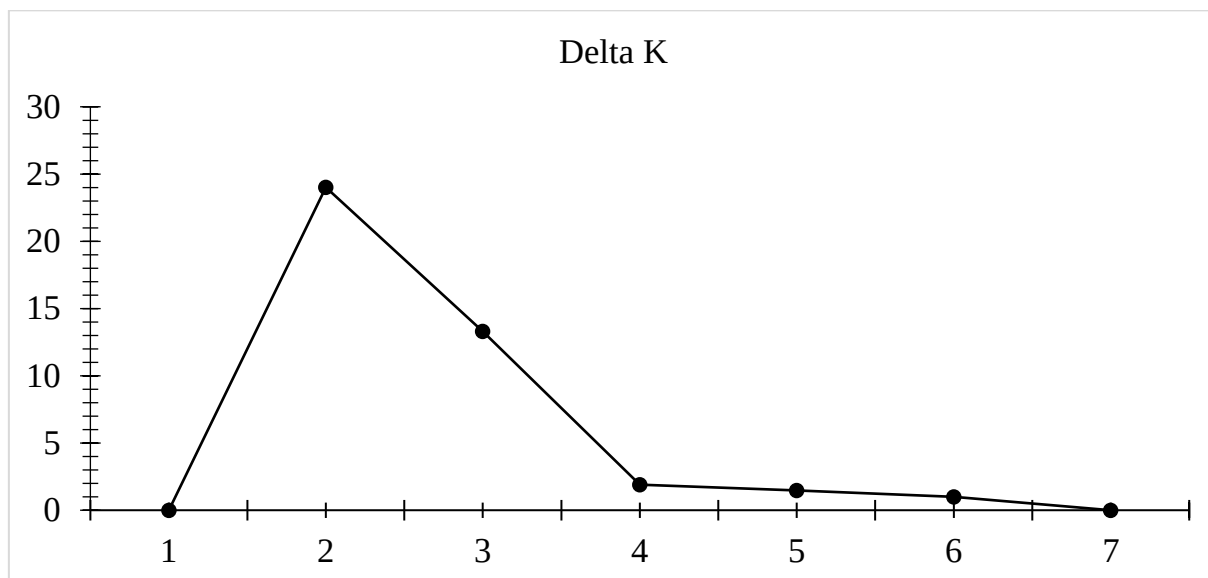


Figura 4. Análise bayesiana realizada pelo programa STRUCTURE. Valores de ΔK evidenciando o melhor K com um pico maior em $k=2$.

Os dois grupos genéticos formados apresentaram um compartilhamento de alelos evidenciados pela mistura de cores, sendo observada uma associação entre os indivíduos (Figura 5).

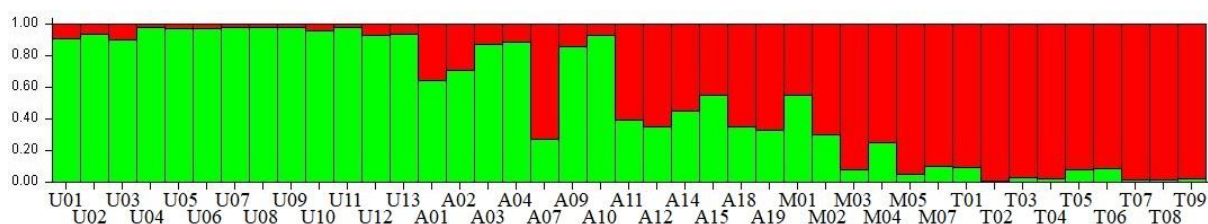


Figura 5. Agrupamento das 41 variedades locais de mandioca por meio do software STRUCTURE, em dois grupos genéticos (vermelho e verde). As linhas verticais ao longo do eixo X representam os indivíduos e os segmentos coloridos ao longo do eixo Y demonstram o coeficiente de associação de cada indivíduo atribuído a cada um dos K.

O primeiro grupo representado pela cor verde alocou 21 variedades locais, com pelo menos uma variedade pertencente a cada um dos cinco grupos do método UPGMA, e o segundo grupo representado pela cor vermelha concentrou 20 variedades locais presentes no Grupo 1 do UPGMA. Essa mistura entre os dois grupos pode ser associada a interação exercida entre os agricultores, que costumam realizar entre eles a troca de material vegetal (manivas), resultando em um fluxo de troca, onde, muitas

vezes ultrapassam municípios e até mesmo regiões (MARTINS; OLIVEIRA, 2009; OLER, 2017; PEDRI et al., 2021).

Este compartilhamento de materiais genéticos entre agricultores faz com que se encontre variedades muito semelhantes em muitas roças, e esta mistura genética de alelos pode ser decorrente da recombinação da reprodução sexuada e posterior incorporação desse material nas roças por meio da deriva genética através do efeito fundador, onde as roças teriam sido implantadas a partir de material heterozigoto e mantido via propagação vegetativa através das trocas de manivas (FARALDO et al., 2000). Este fluxo gênico entre populações estabelecidas reduz a diferenciação genética entre elas, e pode ser um dos mecanismos responsáveis pela introdução de novas variações genéticas na população receptora (WRIGHT, 1931).

4. CONCLUSÕES

A partir dos sete marcadores ISSR utilizados foi possível evidenciar a diversidade genética existente entre as 41 variedades locais de mandioca cultivadas na região da Indicação Geográfica Uarini. Essa diversidade foi revelada pelo percentual de polimorfismo e pelos métodos de agrupamentos UPGMA e STRUCTURE que apontaram a existência de uma estrutura genética entre as populações.

Os métodos de agrupamentos utilizados não separaram as variedades locais por localidade de coleta, podendo estar associado com a troca de manivas de mandioca entre os agricultores da região que, geralmente, cultivam mais de duas variedades em suas roças.

As variedades locais estudadas apresentam diversidade genética com potencial para conservação ou até mesmo para futuros programas de melhoramento genético, valorizando ainda mais a cadeia produtiva da farinha Uarini.

Além da importância acadêmica, este trabalho pode contribuir para o desenvolvimento econômico da cadeia produtiva da farinha Uarini, servindo como base para novos estudos na região e fazendo com que os agricultores se apropriem e entendam melhor a sua importância na manutenção dessa diversidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. A.; CHURCHILL, G. A.; AUTRIQUE, J. E.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, v.36, n.1, p.181-186, 1993.
- BERNARDO, C. O.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 739-746, 2016.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.
- BRANCO, N. P. N. C. S.; CAZUMBÁ, I. R. S.; ANDRADE, A. C. B.; CARDOSO, R. C. V.; DRUZIAN, J. I. Projeto de contribuição à Indicação Geográfica para farinha de mandioca de tipo Copioba: a construção de indicadores sociais para avaliação de impactos em desenvolvimento. **Revista Geintec: Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 4, p. 396-412, 2012.
- CHEN, Y.; PENG, Z.; WU, C.; MA, Z.; DING, G.; CAO, G.; RUAN, S.; LIN, S. Genetic diversity and variation of Chinese fir from Fujian province and Taiwan, China, based on ISSR markers. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175571, 2017.
- CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**. v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2003. v.2, 585p.
- CUCHI, G.; SANTOS CARDOSO, E.; PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; ZORTÉA, K. É. M.; ROSSI, A. A. B. Caracterização molecular de etnovariedades de *Manihot esculenta* Crantz com utilização de marcadores moleculares ISSR. **Conjecturas**, v. 22, n. 13, p. 747-764, 2022.
- EARL, D. A.; VON, H.; BRIDGETT, M. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. 4: 359-361, 2012.
- EMBRAPA. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: processamento da mandioca**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: SEBRAE, 2003, 115p.
- FARALDO, M. I. F.; SILVA, R. M. D.; ANDO, A.; MARTINS, P. S. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 499-505, 2000.

FIGUEREDO, P. E.; TIAGO, A. V.; ZANETTI, G. T.; PINTO, J. M. A.; ROSSI, A. A. B.; HOOGERHEIDE, E. S. S. Diversidade genética de mandiocas na região periurbana de Sinop, Mato Grosso, Brasil. **Magistra**, v. 30, p. 143-153, 2019.

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. **Melhoramento de mandioca no Brasil**. In: CEREDA, M. P. (Ed.) Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 540 p.

GALERA, J. M. S. V.; VALLE, T. L. Estruturação genética do germoplasma de mandioca através de informação comparativas entre estudos biológicos e antropológicos – resultados preliminares. **Revista raízes e amidos Tropicais**, v. 3, n. 1, p. 363-366, 2007.

IDAM, Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas. **Cartilha: Como Cultivar Mandioca**. Manaus, AM: 2019. p. 4.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL – INPI. **Revista da Propriedade Industrial**, n. 2538, 2019.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

MACEDO, K. R. Utilização da parte aérea da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na alimentação de frango de corte de linhagem caipira-revisão de literatura. **Revista Veterinária em Foco**, v. 13, n. 2, 2016.

MARTINS, M. L. L.; ORLANDINI, P.; MENDOZA F., J. M.; SILVEIRA, T. C. *Manihot* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB17600>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

MARTINS, P. S.; OLIVEIRA, G. C. X. **Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos**. In: VIEIRA, I. C. G.; SILVA, J. M. C.; OREN, D. C.; D'INCAO, M. A. Diversidade biológica e cultural da Amazônia. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2009. 373-391p.

MATSUMURA, E. E.; SECCO, V. A.; MOREIRA, R. S., SANTOS, O. J. A. P.; HUNGRIA, M.; OLIVEIRA, A. L. M. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2187-2200, 2015.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 2002. 106p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).

MOJENA, R. Hierárquical grouping method and stopping rules: an evaluation. **The computer Journal**, v. 20, n. 4, p. 359-363, 1977.

MORK, J. **BI 315 lab. course: methods in population genetics**. Trondhjem: Department of Botany, Trondhjem Biological Station, 2000.

OLER, J. R. L. **Etnobotânica e diversidade genética de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.): a manutenção da agrobiodiversidade em comunidades tradicionais de Jangada, Mato Grosso, Brasil**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2017. 149p. (Tese – Doutorado em Biologia Vegetal).

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research; an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PEDRI, E. C. M.; SANTOS, L. L.; WOLF, M. S.; TIAGO, A. V.; SANTOS CARDOSO, E.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; ROSSI, A. A. B. Diversidade genética entre etnovariedades de mandioca cultivadas no norte do estado de Mato Grosso por meio de descritores morfoagronômicos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e25410514871-e25410514871, 2021.

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

SILVA, T. S. S.; FREITAS, J. S.; SANTOS, E. S. L.; DOS SANTOS CARDOSO, T.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 10, p. 4-8, 2018.

TIAGO, A. V.; ROSSI, A. A. B.; TIAGO, P. V.; CARPEJANI, A. A.; SILVA, B. M.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; YAMASHITA, O. M. Genetic diversity in cassava landraces grown on farms in Alta Floresta-MT, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n. 3, p. 1-10, 2016.

WOLF, M. S.; CUCHI, G.; DE PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; SILVA, M. C. M.; ROSSI, A. A. B. Diversidade genética entre etnovariedades de mandioca por meio de marcadores ISSR. **Conjecturas**, v. 22, n. 16, p. 532-546, 2022.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. University of Chicago Press: Chicago, 1978.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi observado a existência da diversidade genética entre as variedades locais de mandioca cultivadas na Indicação Geográfica Uarini para a produção da farinha Uarini, com destaque para uma maior diversidade dentro das populações estudadas, devido a atividade de trocas de manivas entre os produtores. Esse fato foi corroborado pelos métodos de agrupamentos utilizados, que não separaram as variedades locais por localidade de coleta devido ao intercâmbio genético.

A divergência genética entre as variedades locais de mandioca representa um fator importante para a preservação da espécie, além de um potencial a ser explorado em programas de conservação e reprodução em cultivos da espécie, ou até mesmo em programas de melhoramento, com destaque para a população de Alvarães que apresentou maior número de alelos raros e alelos exclusivos. Além disso, o trabalho pode contribuir para o desenvolvimento econômico da cadeia produtiva da farinha Uarini, servindo como base para novos estudos na região e evidenciando a importância dos agricultores na manutenção da diversidade genética da mandioca.