

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA
EVOLUTIVA

**Coleção nuclear para o Banco Ativo de Germoplasma regional da mandioca (*Manihot
esculenta* Crantz) da Embrapa Amazônia Ocidental**

Sandra Barbosa de Sousa

MANAUS- Amazonas
2014

Sandra Barbosa de Sousa

**Coleção nuclear para o Banco Ativo de Germoplasma regional da mandioca (*Manihot
esculenta* Crantz) da Embrapa Amazônia Ocidental**

Orientador: Charles R. Clement

Co-orientadora: Nelcimar R. Sousa

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS- Amazonas

2014

FICHA CATALOGRAFICA

S725 Sousa, Sandra Barbosa de

Coleção nuclear para o Banco Ativo de Germoplasma regional da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da Embrapa Amazônia Ocidental / Sandra Barbosa de Sousa. --- Manaus: [s.n.], 2014.

53 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.

Orientador: Charles Roland Clement

Coorientadora: Nelcimar Reis Sousa

Área de concentração: Genética, conservação e biologia evolutiva

1. Mandioca. 2. Caracterização molecular. 3. Genética. I.
Título.

CDD 633.682

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, minha base, minha força, meu sustento, meu amigo, meu tudo, pela oportunidade e por ser o primeiro em acreditar em mim!

Ao meu orientador Dr. Charles Roland Clement, pelos ensinamentos, paciência, objetividade e dedicação á pesquisa.

Á minha co-orientadora Dra Nelcimar Reis Sousa, pelos seis anos de formação acadêmica que me aguentou. Foram muitos momentos e ensinamentos, com os quais cresci muito.

Á Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudo durante o mestrado.

A Embrapa Amazônia Ocidental, pela infra-estrutura onde foi possível desenvolver a pesquisa.

Ao M.Sc. Miguel Costa Dias, pela parceria neste trabalho e por liberar suas relíquias anotadas.

Ao Dr. Gilvan Ferreira da Silva, pela amizade, preocupação e incentivos únicos que só ele tem.

Aos membros da banca julgadora Dra Gislene Almeida Carvalho-Zilse, Dra Nara Fernandes Moura e Dra Elisa Ferreira Moura Cunha pelas sugestões e contribuições na melhoria desta dissertação.

Aos Docentes do PPG-GCBEV que colaboraram para formação da turma 2012. Á minha turma de mestrado, que mesmo na correria das disciplinas me proporcionaram momentos de muita descontração, e em especial a Maysa Vera Matos, parceira e amiga pela ajuda nas horas difíceis e dramas básicos. Muito obrigada pela confecção do mapa apresentado na pagina 32.

Á Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Dra. Eliana Feldberg, pela disponibilidade em atender as necessidades dos discentes.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular/EMBRAPA, por aguentarem minhas reclamações, em especial ao técnico Jeferson Cruz, pela sua “paciência de Jó” e ajuda no decorrer desses anos.

A todos que direta e indiretamente contribuirão para a realização deste.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é a quinta produtora de alimentos mais importante no mundo. Seu centro de domesticação está no sudoeste da Amazônia. Em mandiocas cultivadas depois da domesticação inicial, pressões seletivas divergentes deram origem a dois grupos de variedades: amargas e mansas. A variação gerada nas roças dos mandiocultores serve como fonte de enriquecimento para os bancos de germoplasma da espécie. Para que seja eficientemente utilizado necessita de caracterização morfológica e genética. Os marcadores moleculares podem refletir diretamente a variabilidade genética de germoplasma em nível de DNA, sem a interferência do meio ambiente, e tornaram-se dados valiosos para avaliar a diversidade genética. Foram utilizados 470 acessos que compõem o banco de germoplasma da Embrapa. Dez loci de microssatélites foram utilizados para avaliar a diversidade genética e verificar a estruturação dentro do banco. Através da análise bayesiana foi possível encontrar 4 agrupamentos da estruturação genética dos 470 acessos, sendo que o agrupamento em $K = 2$ correspondeu aproximadamente com os grupos de mandioca amarga e mansa. No entanto, para estruturação geográfica nenhum dos $K = 2, 3, 5$ e 7 identificaram grupos geográficos interpretáveis. Os dados dos SSR genotipados foram implementados pelo software Powercore, o qual indicou uma coleção nuclear com 56 acessos que foi capaz de capturar o máximo de variação alélica (113). O índice de Shannon foi de 1,74 na coleção nuclear e 1,53 no banco de germoplasma. A análise de variância molecular mostrou que quase 100% da diversidade genética está dentro dos dois grupos CN e BAG.

ABSTRACT

Manioc (*Manihot esculenta* Crantz) is the fifth most important food produced in the world. Its center of domestication is in southwestern Amazonia. After the initial domestication, divergent selection pressures yielded two groups of varieties: sweet and bitter. The variation generated in farmers' fields serves as a source of enrichment for germoplasm banks of the species. Efficient use requires morphologic and genetic characterization. Generally, molecular markers directly reflect genetic variation in germplasm at the DNA level, without interference from the environment, and offer valuable information to assess genetic diversity. The Embrapa manioc germplasm bank contains 470 accessions that were analyzed with 10 microsatellite loci to assess genetic diversity and structuring within the bank. Through the bayesian analysis it was possible to find four clusters of the genetic structure of the 470 accessions, and the grouping in $K = 2$ corresponded roughly to the bitter and sweet manioc groups. However, for geographic structuring none of the $K = 2, 3, 5, 7$ identified interpretable geographical groups. Data from the genotyped SSR were implemented by the Powercore software, which indicated a core collection with 56 accessions that was able to capture the maximum of allelic variation (113). The Shannon index was 1.74 in the core collection and 1.53 in the germplasm bank. The analysis of molecular variance showed that almost 100% of the genetic diversity is within the two groups CN and BAG.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPITULO 1.....	25
RESUMO.....	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
MATERIAL VEGETAL	28
EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DOS MICROSSATÉLITES.....	29
ANÁLISE DOS DADOS.....	30
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37
CAPITULO 2.....	40
RESUMO.....	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E METÓDOS	44
MATERIAL VEGETAL.....	44
DESENVOLVIMENTO DA COLEÇÃO NUCLEAR	44

RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE	53

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Características dos 10 loci de SSR, analisados em 470 acessos do BAG, incluindo temperatura de anelamento (T_a), Tamanho do alelo em pares de base (TA), número de alelos por loco (A), Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_E), Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC).

Tabela 2: Parâmetros de diversidade genética (Nei, 1987) de mandioca mantido no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental para os grupos identificados por Structure a $k=2$ e as variedades admixture Q ($< 0,80\%$ Grupo 3). No Grupo 1 as mandiocas mansas predominam, enquanto que no Grupo 2 as mandiocas amargas predominam.

Tabela 3: Parâmetros de diversidade genética (Nei, 1987) de mandioca mantido no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental com as variedades agrupadas por calha hidrográfica do Estado do Amazonas.

Capítulo 2

Tabela 1: Média dos parâmetros de diversidade usados para comparar no Banco Ativo de Germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental e na Coleção Nuclear desenhada com apoio de Powercore, onde Número total de alelos (N_a), Heterozigosidade Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_E), Índice de Shannon (I) e Desvio padrão (\pm).

Tabela 2: Valores da riqueza alélica calculados para os dez loci de microssatélites, comparando Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca e Coleção Nuclear, inclusive os acessos da Bahia.

Tabela 3: Análise de variância molecular dos 470 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de mandioca e os 56 da Coleção Nuclear.

Tabela 4: Lista dos 56 acessos selecionados para compor a Coleção Nuclear e suas identificações no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca, da Embrapa Amazônia Ocidental, com sua classificação (brava, mansa, sem informação) e localização geográfica por município e calha.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Mapa com as 36 localidades do Amazonas que contribuíram com variedades para o Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas: 1- Manaus, 2- Manaquiri, 3- Autazes, 4- Iranduba, 5- Urucará, 6- Itapiranga, 7- São Sebastião do Uatumã, 8- Manacapuru, 9- Boa Vista do Ramos, 10- Barreirinha, 11- Barcelos, 12- Santa Isabel do Rio Negro, 13- Itacoatiara, 14- Nhamundá, 15- Anamá, 16- Presidente Figueiredo, 17- Tabatinga, 18- Benjamin Constant, 19- Atalaia do Norte, 20- Nova Olinda do Norte, 21- Borba, 22- Tefé, 23- Alvarães, 24- Anori, 25- Uarini, 26- Novo Airão, 27- Novo Aripuanã, 28- Manicoré, 29- Humaitá, 30- São Paulo de Olivença, 31- Canutama, 32- Lábrea, 33- Pauini, 34- Boca do Acre, 35-Guajará, 36- Parintins.

Figura 2: Valores de ΔK de possíveis dois grupos para 470 variedades de germoplasma de mandioca do BAG da Embrapa com 20 simulações com o Structure sem informação a priori.

Figura 3: Análise de agrupamento das 470 subamostras de mandioca do BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental com $k=2$ grupos, ordenado de acordo com o valor de Q ($>80\%$) de probabilidade, em vermelho grupo predominante de macaxeiras e verde de mandiocas.

Figura 4: Representação gráfica da análise de coordenadas principais (PCoA) dos 470 genótipos de mandioca, avaliados a partir de marcadores moleculares SSRs. A- grupos STRUCTURE (vermelho grupo predominante de macaxeiras, verde os de mandiocas e em azul grupo *admixture*; B- Grupos caracterizados (HCN- vermelho macaxeiras, verde mandiocas e em azul não caracterizados).

Figura 5: Agrupamento dos 470 acessos de mandioca representado no dendrograma usando o algoritmo de neighbor-joining e distância genética de Nei (1983) estimadas com 10 loci de SSR. Cada acesso é representado por um ramo, colorido com base nas calhas hidrográficas: amarelo - Rio Amazonas; verde - Rio Solimões; vermelho - Rio Madeira; rosa - Rio Negro; cinza - Rio Purus; e azul - Sem identificação.

Capítulo 2

Figura 1: Distribuição de frequência dos 113 alelos, recuperados na coleção nuclear definida (56 acessos) versus toda a coleção (470 acessos).

Figura 2: Representatividade do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca, Embrapa Amazônia Ocidental, em termos de número de acessos por calha hidrográfica, e representatividade da Coleção Nuclear, escolhidas pela maximização de alelos.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) constitui uma das mais importantes fontes de carboidratos empregada na alimentação humana, animal e na indústria. A mandioca é, atualmente, a quinta cultura mais importante em produção de alimentos no mundo, principalmente na região dos trópicos, e serve como alimento básico para mais de 800 milhões de pessoas (Lebot, 2009; FAO, 2012). O Brasil é o terceiro produtor de mandioca, com 23 milhões de toneladas em 2012, perdendo somente para a Nigéria, com 54 milhões de toneladas, e a Indonésia, com quase 24 milhões de toneladas (FAO, 2012). O produto é uma das principais fontes de renda nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. A região Norte se destaca como a segunda maior produtora de mandioca, com 7,6 milhões de toneladas em 2013; a região Nordeste produziu 8,1 toneladas no mesmo período (IBGE, 2013).

A mandioca é uma das 98 espécies do gênero *Manihot* da família Euforbiácea. Neste gênero duas espécies apresentam importância econômica: a *Manihot esculenta* Crantz, com raízes tuberosas para produção de farinha, amido, consumo *in natura*, e uso industrial; e *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (maniçoba) para produção de látex (Faraldo *et al.*, 2000; Fukuda e Silva, 2002).

A mandioca (*Manihot esculenta* ssp. *esculenta*) provavelmente foi domesticada de populações silvestres de *M. esculenta* ssp. *flabellifolia* no sudoeste da Amazônia, entre os estados de Rondônia, Mato Grosso e leste do Acre no Brasil e nordeste da Bolívia (Olsen e Schaal, 1999; Olsen e Schaal, 2001; Olsen, 2004; Schaal *et al.*, 2006). Após sua domesticação, diferentes forças seletivas originaram dois grupos de variedades: a mandioca mansa (mandioca doce, macaxeira ou aipim) e a mandioca amarga (mandioca brava) (Mühlen *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2004). Essas variedades possuem características diferenciadas quanto ao teor de ácido cianídrico. Mandioca mansa possui teor de ácido cianídrico por quilo de raiz fresca inferior a 100 mg e a mandioca amarga possui teor de ácido cianídrico por quilo de raiz fresca superior a 100 mg (McKey *et al.*, 2010). Produtores costumam associar a mandioca amarga ao paladar amargo e é comprovado que o gosto está relacionado ao potencial tóxico (McKey *et al.*, 2010). A variação no teor de ácido cianídrico não tem associação com caracteres morfológicos (McKey e Beckerman, 1993), mas a distinção entre estas variedades é imediata entre agricultores tradicionais e suportada por análises moleculares (Mühlen *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2004; Peroni *et al.*, 2007).

Na Amazônia, a cultura é disseminada entre os agricultores familiares de populações tradicionais ao longo da calha dos grandes rios por meio da troca de manivas. Essas variedades locais de mandioca representam tanto a base como excelente reserva de variabilidade genética para enriquecimento das coleções de germoplasma. Em função da importância da cultura para o país, foram criados e vêm sendo mantidos bancos de germoplasma (Silva *et al.*, 2001) para apoiar programas de melhoramento no Brasil. A maioria dos bancos são mantidos pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária e algumas instituições estaduais de pesquisa e desenvolvimento agrícola (Nass, 2007).

Os bancos de germoplasma são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro. Podem ser classificados em **bancos de base** - aqueles em que se conserva o germoplasma em câmaras frias, vista como uma estratégia de segurança e não são utilizados para intercâmbio e **bancos ativos** - é usado para propósitos de pesquisa, nos quais ocorre o intercâmbio de germoplasma e plantio frequente para a caracterização (Netto, 2010).

Os bancos de germoplasma têm como objetivos conservar e utilizar a variabilidade genética dos recursos genéticos. Para que o banco de germoplasma seja realmente utilizado, há necessidade das seguintes atividades: **Conservação** dos recursos genéticos, que precisam ser armazenados de forma que permaneçam viáveis a longo prazo; **Caracterização**, que pode ser morfológica, agrônômica e molecular, visto que antes da incorporação dos recursos genéticos em programas de melhoramento é necessário identificar características de importância para a cultura; **Coleta** com a finalidade de conservação dos genótipos passíveis de erosão, assim como enriquecer a variabilidade genética da coleção; **Intercâmbio**, que abrange a entrada de amostras oriundas de outros bancos e o envio para outras instituições, sempre que necessário (Bonow, 2007); e a **Documentação** dos dados sobre os recursos genéticos conservados para que estejam disponíveis aos usuários (Nass, 2007).

No Brasil, existe uma ampla variabilidade genética de mandioca, que se encontra mantida em coleções de trabalho e bancos ativos de germoplasma distribuídos em todo o país. Centros internacionais de pesquisa em agricultura têm mostrado grande interesse na caracterização e manutenção de recursos genéticos, como também em aumentar as coleções e introduzir novos acessos. Dentre os centros, destaca-se o Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, na Colômbia, o Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN da Embrapa e o Instituto Agrônomo de Campinas - IAC (Faraldo *et al.*,

2002). O germoplasma de mandioca da Embrapa é mantido nos seguintes Bancos Ativo de Germoplasma (BAG): BAG Regional para a Amazônia Ocidental em Manaus, AM; BAG Regional para a Amazônia Oriental em Belém, PA; BAG Regional para o Nordeste e Tabuleiros Costeiros em Cruz das Almas, BA; BAG Regional para o Semi-Árido do Nordeste brasileiro em Petrolina, PE; BAG Regional para os Cerrados em Planaltina, DF (Nass, 2007).

O BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental existe desde 1994 e os acessos que o constituem foram coletados em diversas localidades da bacia amazônica, principalmente no Estado do Amazonas. Para culturas propagadas vegetativamente, como é o caso da mandioca, a forma mais comum utilizada na conservação do germoplasma é sob condições de campo. Isso gera um custo considerável, principalmente quando se trata de coleções de grande porte, além de representar um risco na perda de materiais, determinado por fatores bióticos e abióticos. Geralmente as coleções de mandioca se caracterizam por apresentarem altos índices de amostras duplicadas em função da grande sinonímia de nomes comuns observada nessa espécie (Silva *et al.*, 1992). O índice de acessos duplicados nas coleções de mandioca foi estimado em cerca de 30% por Costa e Morales (1994), que além de elevar o custo com manutenção também reduz a representatividade e a eficiência para uso em programas de melhoramento genético.

O manejo e a utilização da diversidade mantida nos bancos de germoplasma são os principais desafios enfrentados por curadores e melhoristas (Upadhyaya *et al.*, 2011), visto que a utilização destes bancos depende da quantidade e qualidade dos dados disponíveis (Thormann *et al.*, 2012). O número de amostras de germoplasma conservado não corresponde ao número de amostras utilizado, indicando que os bancos não estão sendo usadas em todo o seu potencial (Upadhyaya e Gowda, 2009). Essa é uma característica comum das grandes coleções devido à dificuldade de caracterizar e avaliar um número elevado de amostras. A indisponibilidade de informações específicas sobre o germoplasma, como dados de passaporte, caracterização e avaliação, representa uma restrição para utilização de recursos genéticos (FAO, 2010). Damania (2008) comenta que, no futuro, a utilidade do banco de germoplasma dependerá do mapeamento de genes relevantes, especialmente aqueles encontrados nos parentes silvestres, que é um novo desafio importante para adaptar os cultivos às mudanças climáticas ora em curso.

Diferentes autores têm sugerido estratégias para melhorar a gestão de grandes coleções; a que mais ganhou aceitação é a Coleção Nuclear (CN). A proposta de Frankel e

Brown (1984) era que o germoplasma poderia ser organizado por meio da criação de uma coleção nuclear, com um mínimo de duplicações. A coleção nuclear é definida como sendo um conjunto reduzido de amostras oriundas de uma coleção de germoplasma, escolhidos para representar a variabilidade genética com o mínimo de repetitividade (Brown e Spillane, 1999). Devido ao seu tamanho reduzido, a coleção pode ser estudada intensivamente e as informações obtidas podem ser usadas para orientar a utilização mais eficiente do germoplasma em programas de melhoramento, bem como no banco de modo geral. Adicionalmente, a coleção nuclear possibilita a aplicação de estratégias que reúnam atividades de caracterização e avaliação, formando uma base completa de informações que promove o uso amplo e eficiente do germoplasma (Cordeiro e Abadie, 2007).

Para estabelecer uma coleção nuclear consiste em adotar um exercício de amostragem ordenado em etapas. Brown (1989) e Van Hintum *et al.* (2000) recomendam cinco etapas: **identificação do material** a ser amostrado, definição do **tamanho da coleção nuclear**, que normalmente varia de 5 a 20% da coleção inteira, **dividir a coleção** base em grupos distintos a fim de obter uma representação eficaz da diversidade genética, determinar o **número de amostras por grupo** visando a determinação da proporção com que cada estrato será representado e a última etapa é a **seleção das amostras nos grupos** que serão incluídos na CN. Tradicionalmente, os critérios mais usados para criar uma coleção nuclear eram: a origem geográfica (95% das coleções nucleares publicadas), características morfológicas (77%), grupos taxonômicos específicos e intra-específicos (63%), regiões ecogeográficas (34%) e marcadores genéticos (10%) (Brown e Spillane, 1999). No entanto, atualmente o uso de marcadores genéticos tem aumentado na criação e caracterização de coleções nucleares (Sun *et al.*, 2012; Belaj *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

Desde então foram estabelecidas diversas coleções nucleares de espécies cultivadas. O Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) definiu uma coleção nuclear de mandioca com base na origem geográfica, diversidade morfológica, diversidade de padrões de bandas da enzima esterase (Hershey *et al.*, 1994). A coleção nuclear de mandioca a representatividade da diversidade no Brasil foi formada por 462 amostras, quase 17% do total existente na coleção inteira (Cordeiro e Abadie, 2007).

O estabelecimento de uma coleção nuclear é uma estratégia que prioriza e concentra atividades de caracterização e avaliação, formando uma base de informação mais completa dos acessos, melhorando de forma efetiva a conservação, acessibilidade e o uso de recursos

genéticos (Cordeiro e Abadie, 2007). De acordo com Brown (1989), van Hintum *et al.* (2000) e Gouesnard *et al.* (2001), existem diferentes estratégias de como formar coleções nucleares e o uso delas depende das informações disponíveis do material estudado, sejam caracteres agromorfológicos ou moleculares.

Atualmente alguns softwares, como o MSTRAT (Gouesnard *et al.*, 2001), o Powercore (Kim *et al.*, 2007) e o Corefinder (Policriti e Sgarro, 2011) vem sendo utilizados para construir coleções nucleares para várias espécies de importância para a agricultura mundial. Eles utilizam a estratégia de maximização (M), em que as amostras são diretamente selecionadas a partir da coleção inteira, maximizando o número de alelos observados em cada loco. Esta estratégia é a mais indicada para dados moleculares.

A representação da diversidade na coleção nuclear é comparada estatisticamente com a da coleção inteira para confirmar se a coleção nuclear tem capturado a maioria da diversidade de toda a coleção (Upadhyaya *et al.*, 2010). Para isto, os acessos devem ser selecionados com maior diversidade, buscando representar a cobertura total de alelos e as características presentes na coleção inteira (Belaj *et al.*, 2012).

A diversidade molecular pode ser avaliada por meio de diferentes marcadores moleculares. Com o auxílio de programas computacionais é possível calcular a frequência alélica e estimar estatísticas básicas, como o conteúdo de informação polimórfica, riqueza alélica, diversidade genética, heterozigosidade e ocorrências de alelos únicos, raros, comuns e mais frequentes na população (Upadhyaya e Gowda, 2009). Os dados de marcadores moleculares vêm sendo muito utilizados na formação de CN em diferentes culturas (Staub *et al.*, 2002; Araújo, 2008; Díez *et al.*, 2012). O polimorfismo analisado por marcadores microssatélites mostrou ser uma metodologia capaz de gerar uma coleção nuclear que potencialmente reflete a riqueza alélica (Agrama, 2009; Pessoa-Filho *et al.*, 2010).

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente, e que correspondem a regiões expressas ou não do genoma (Milach, 1998; Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os marcadores moleculares permitem acessar uma fração do genótipo do indivíduo. A variação molecular vem sendo frequentemente analisada em coleções de germoplasma de espécies vegetais, tanto para complementar a caracterização existente, como para responder as questões sobre as relações genéticas do germoplasma (Sousa *et al.*, 2009).

Os microssatélites são uma classe muito popular de marcador molecular e amplamente utilizado em estudos de genética de populações, de evolução de populações naturais, identificação de variedades, caracterização de genótipos, estudos de diversidade genética, análise de paternidade e forense (Moxon e Wills, 1999). São pequenas sequencias de 1 a 6 nucleotídeos repetidas lado a lado (*in tandem*), distribuídas ampla e aleatoriamente no genoma dos eucariotos (Lima, 2008). Em estudos que avaliam a diversidade genética nas coleções nucleares os microssatélites vem sendo usado por vários autores (Kuroda *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Fricano *et al.*, 2012; Soto-Cerda *et al.*, 2013; Cosson *et al.*, 2014).

Esta dissertação é formada por dois capítulos que visam caracterizar e contribuir para o aumento da utilização da coleção de germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental, composta de 470 acessos, entre mandiocas amargas e mansas, coletados ao longo da bacia amazônica nas calhas dos rios Solimões, Purus, Madeira, Negro e Baixo Amazonas, por meio de marcadores moleculares microssatélites (SSR). No capítulo 1 foi analisada a diversidade genética em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) conservada *ex-situ* no Amazonas, utilizando marcadores microssatélites. No capítulo 2 foi desenhada uma coleção nuclear no banco ativo de germoplasma de mandioca na Embrapa Amazônia Ocidental.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Criar uma coleção nuclear dentro do Banco Ativo de Germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca com marcadores microssatélites;
- Desenhar uma Coleção Nuclear que represente o BAG com base em informação geográfica e molecular;
- Avaliar a representatividade da Coleção Nuclear em termos da proporção de variabilidade genética captada em comparação com o BAG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrama, H. A.; Yan, W. G.; Jia, M.; Fjellstrom, R.; McClung, A. M. 2009. Genetic Assessment of a Mini-Core Subset Developed from the USDA Rice Genebank. *Crop Science*, 49: 1336–1346.
- Araújo, M. de C. 2008. Uma coleção nuclear de pupunha na Amazônia brasileira. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 91p.
- Belaj, A.; Dominguez-García, M.; Atienza, S.; Martín Urdíroz, N.; De La Rosa, R.; Satovic, Z.; Martín, A.; Kilian, A.; Trujillo, I.; Valpuesta, V.; Del Río, C. 2012. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genetics & Genomes*, 8: 365–378.
- Bonow, S. 2007. Coleções nucleares em bancos de germoplasma: conceito e utilização atual em trigo. Passo Fundo: Embrapa trigo, 7p. (www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do80.htm). Acesso em 20/10/2012.
- Brown, A. H. D.; Spillane, C. 1999. Implementing core collections - principles, procedures, progress, problems and promise. In: Johnson, R. C.; Hodgkin, T. (Ed.). *Core collections for today and tomorrow*. International Plant Genetic Resource Institute, Rome, Italy, pp.1-9.
- Brown, A. H. D. 1989. The case for core collections. In: Brown, A. H. D. et al. (Ed.). *The use of plant genetic resources*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 136-156.
- Cordeiro, C. M. T.; Abadie, T. 2007. Coleções nucleares. In: Nass, L. L. (Ed.) *Recursos genéticos vegetais*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, pp.576-604.
- Cosson, P.; Decroocq, V.; Revers F. 2014. Development and characterization of 96 microsatellite markers suitable for QTL mapping and accession control in an Arabidopsis core collection. *Plant Methods*, 10:2.
- Costa, L. R. S.; Morales, E. A. V. 1994. Cassava Genetic Resources in South America. In: *Report of the first meeting of the international Network for Cassava genetic Resources, held at CIAT, Cali, Colombia*. International Plant Genetic Resource Institute, Rome, pp.16-20.
- Damania, A. B. 2008. History, achievements, and current status of genetic resources conservation. *Agronomy Journal*, 100: 9–21.

- Díez, C.; M. Imperato, A.; Rallo, L.; Barranco, D.; Trujillo, I. 2012. Worldwide Core Collection of Olive Cultivars Based on Simple Sequence Repeat and Morphological Markers. *Crop Science Society of America*, 52: 211–221.
- Elias, M.; Mühlen, G. S.; McKey, D.; Roa, A. C.; Tohme, J. 2004. Genetic diversity of traditional South American landraces of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): An analysis using microsatellites, *Economic Botany*, 58(2): 242-256.
- FAO. 2012. *Second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Faraldo, M. I. F.; Silva, R. M de.; Ando, A.; Veasey, E. 2002. Marcadores moleculares em mandioca. In: CEREDA, M. P (Coord.) *Agricultura: Tuberosas amiláceas Latino Americano*, Fundação Cargill, São Paulo, 540 p.
- Faraldo, M. I. F.; Silva, R. M.; Ando, A.; Martins, P. S. 2000. Variabilidade Genética de Etnovarietades de Mandioca em regiões geográficas do Brasil. *Scientia Agricola*, 57(3): 499-505.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa Cenargen, Brasília, 220 p.
- Frankel, O. H.; Brown, A. H. D. 1984. Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: Holden, J. H. W.; Williams, J. T. (Ed.). *Crop genetic resources: conservation and evaluation*. Allen and Unwin, London, 296 p.
- Fricano, A.; Bakaher, N.; Del Corvo, M.; Piffanelli, P.; Donini, P.; Stella, A.; Ivanov, N. V.; Pozzi, C. 2012. Molecular diversity, population structure, and linkage disequilibrium in a worldwide collection of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *BMC Genetics*, 13:18.
- Fukuda, W. M. G.; Silva, S. O. 2002. Melhoramento de mandioca no Brasil. In: Cereda, M. P. *Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill.
- Gouesnard, B.; Bataillon, T.M.; Decoux, G.; Rozale, C.; Schoen, D. J.; David, J.L. 2001. MSTRAT: an algorithm for building germplasm core collections by maximizing allelic or phenotypic richness. *J Hered*, 92:93–94.
- Hershey, C.; Iglesias. C.; Iwanaga, M.; Tohme, J. 1994. Definition of a Core Collection for Cassava. Report for the First Meeting of the International Network for Cassava Genetic Resources, Aug. 1992. *Calif: CIAT*, pp. 145–156.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Agrícola. Disponível em (www.sidra.ibge.gov.br). Acesso em março de 2013.

- Kim, K.W.; Chung, H.K.; Cho, G.T.; Ma, K.H.; Chandrabalan, D.; Gwag, J.G.; Kim, T.S.; Cho, E.G.; Park, Y.J. 2007. PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing allele mining sets. *Bioinformatics*, 23: 2155–2162.
- Kuroda, Y.; Tomooka, N.; Kaga, A.; Wanigadeva, S. M. S. W.; Vaughan, D. A. 2009. Genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) and Japanese cultivated soybeans [*G. max* (L.) Merr.] based on microsatellite (SSR) analysis and the selection of a core collection. *Genet Resour Crop Evol*, 56:1045–1055.
- Lebot V (2009). Tropical roots and tuber crops: Cassava, sweet potato, yams and aroids. CABI, Oxford, UK.
- Lima, M. de L. A. 2008. Marcadores Moleculares. In: Bittencourt, J. V. M., Lima, M. de L. A (Eds) *Manual de Biologia Molecular em plantas arbóreas* – Curitiba: CBAB, p.69-78.
- McKEY, D.; Beckerman, S. 1993. Chemical ecology, plant evolution and traditional manioc cultivation systems. In: Hladik, C.M.; Hladik, A.; Linares, O.F.; Pagezy, H.; Semple, A.; Hadley, M. (Ed.) *Tropical forests, people and food. Biocultural interactions and applications to development*. v.13. Paris: UNESCO, p.85-112.
- McKey, D.; Cavagnaro, T. R.; Cliff, J.; Gleadow, R. 2010. Chemical ecology in coupled human and natural systems: people, manioc, multitrophic interactions and global change. *Chemoecology*, 20: 109–133.
- Milach, S. C. K. 1998. Marcadores Moleculares em Plantas. Porto Alegre. 141 p.:il.
- Moxon, E.R.; Wills, C. 1999. DNA Microsatélites: Agents of Evolution? *Scientific American*, p.72-77.
- Mühlen, G. S.; Martins, P. S.; Ando, A. 2000. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.57, n.2, p.319- 328.
- Nass, L. L. 2007. *Recursos genéticos vegetais*. Brasília- DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 858 p.
- Netto, D. A. M. 2010. Coleção de base e coleção ativa: banco de germoplasma de sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 27 p. (http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2010/documento/Doc_99.pdf). Acesso em 20/10/2012.

- Oliveira, E.J.; Ferreira, C.F.; Santos, V.S.; Oliveira, G.A.F. 2014. Development of a cassava core collection based on single nucleotide polymorphism markers. *Genet. Mol. Res.* 13: 6472-6485.
- Olsen, K. M. 2004. SNPs, SSRs and inferences on Cassava's origin. *Plant Molecular Biology*, 56: 517-526.
- Olsen, K. M.; Schaal, B. A. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceeding of the national Academy of Sciences of the United states of America*, 96: 5586- 5591.
- Olsen, K. M.; Schaal, B. A. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazon origin of domestication. *American journal of Botany*, Columbus, 88:131-142.
- Peroni, N.; Kageyama, P.; Begossi, A. 2007. Molecular differentiation, diversity, and folk classification of "sweet" and "bitter" Cassava (*Manihot esculenta*) in Caiçara and Caboclo management systems(Brazil). *Genetic resources Crop Evolution*, 54: 1333-1349.
- Pessoa-Filho, M.; Rangel, P. H. N.; Ferreira, M. E. 2010. Extracting samples of high diversity from thematic collections of large gene banks using a genetic-distance based approach. *BMC Plant Biology*, 10:127.
- Policriti, A; Sgarro, A. 2011. CoreFinder v.1.0d. Disponível <http://www.appliedgenomics.org/services/software/>. Acesso em 10 de abril 2011.
- Schaal, B. A.; Olsen, K. M.; Carvalho, L. J. C. B. 2006. Evolution, domestication, and agrobiodiversity in the tropical crop cassava. In: Motley, T. J.; Zerega, N., Hugs, H. (Eds). *Drawin`s harvest – New approaches to the origins, evolution, and conservation of cross*. New York: Columbia University Press. p. 269-284.
- Silva, S. de O.; Monoel, T.S. Jr.; Silva, R. P. da. 1992. Diferenciação de clones de *Manihot esculenta* Crantz mediante o emprego de características botânico -agronômicas e zimograma de alfa e beta esterase. *Revista Brasileira de Mandioca*. Cruz das Almas (BA), v. 11 (1), p.79-88.
- Silva, R. M.; Bandel, G.; Faraldo, M. I. F.; Martins, P. S. 2001. Biologia Reprodutiva de Etnovarietades de Mandioca. *Scientia Agrícola*. 58(1), p.101-107.
- Soto-Cerda, B. J; Diederichsen, A; Ragupathy, R; Cloutier, S. 2013. Genetic characterization of a core collection of flax (*Linum usitatissimum* L.) suitable for

- association mapping studies and evidence of divergent selection between fiber and linseed types. *BMC Plant Biology*, 13:78.
- Sousa, N. R.; Filho, F. J. do N.; Souza, A. das G. C. 2009. Caracterização, avaliação e documentação de recursos genéticos de espécies amazônicas. In: Borém, A., Lopes, M. T. G., Clement, C. R. (Eds) *Domesticação e Melhoramento: espécies amazônicas* –Viçosa, MG, 486 p.
- Staub, J.E.; Dane, F.; Reitsma, K.; Fazio, G.; L'opez-ses'e, A. 2002. The formation of test arrays and a core collection in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using phenotypic and molecular marker data. *J Am Soc Hort Sci* ,127: 558–567.
- Sun, Q.; Bai, L.; Ke, L.; Xiang, X.; Zhao, J.; Ou, L. 2011. Developing a core collection of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) based on EST-SSR genotype data and agronomic traits. *Scientia Horticulturae*, 146: 29–38.
- Thormann, I.; Gaisberger, H.; Mattei, F.; Snook, L.; Arnaud, E. 2012. Digitization and online availability of original collecting mission data to improve data quality and enhance the conservation and use of plant genetic resources. *Genet Resour Crop Evol*, 59: 635–644.
- Upadhyaya, H.D.; Gowda, C. L.L. 2009. Managing and Enhancing the Use of Germplasm – Strategies and Methodologies. Technical Manual no. 10. Patancheru 502 324, *Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*, 236 pp.
- Upadhyaya, H. D.; Yadav, D.; Dronavalli, N.; Gowda, C. L. L.; Singh, S. 2010. Mini core germplasm collections for infusing genetic diversity in plant breeding programs. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 1(4): 1294-1309.
- Upadhyaya, H. D.; Dwivedi, S. L.; Ambrose, M.; Ellis, N.; Berger, J.; Smy'kal, P.; Debouck, D.; Duc, G.; Dumet, D.; Flavell, A.; Sharma, S. K.; Mallikarjuna, N.; Gowda, C. L. L. 2011. Legume genetic resources: management, diversity assessment, and utilization in crop improvement. *Euphytica*, 180:27–47.
- van Hintum, T. J. L.; Brown, A. H. D.; Spillane, C.; Hodgkin, T. 2000. Core collections of plant genetic resources. *Technical Bulletin N°3*. Rome, Italy: IPGRI.
- Zhang, P.; Li, J.; Li, X.; Liu, X.; Zhao, X.; Lu, Y. 2011. Population Structure and Genetic Diversity in a Rice Core Collection (*Oryza sativa* L.) Investigated with SSR Markers. *PLoS ONE* 6(12): e 27565.

Capítulo 1

Sousa, S. B.; Clement, C.R.; Sousa, N. R. 2014.

Diversidade genética em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) conservada *ex-situ* no Amazonas, utilizando marcadores microssatélites.

Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*.

Diversidade genética em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) conservada *ex-situ* no Amazonas, utilizando marcadores microssatélites

Sandra BARBOSA DE SOUSA¹, Charles R. CLEMENT¹, Nelcimar REIS SOUSA²,

¹Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Programa de Pós graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

²Embrapa Amazônia Ocidental

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade genética de 470 acessos de mandioca do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental utilizando marcadores microssatélites. Foram avaliados acessos coletados na Amazônia representando as diferentes calhas hidrográficas: Rio Solimões, Purus, Madeira, Negro e Amazonas. Os dez loci apresentaram altos índices de diversidade genética, o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,38 a 0,84, e a média de alelos por loco foi de 11,3. Os acessos do Rio Madeira apresentaram maior índice de Shannon (1,52), assim como o maior número de alelos privados (19). A análise bayesiana implementada pelo STRUCTURE determinou que K=2 foi a que melhor corresponde a estruturação de diferenciação entre mandiocas amargas e mansas.

Palavras-chave: germoplasma; acessos; caracterização molecular; estruturação geográfica; mandioca brava e mansa.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the genetic diversity of 470 accessions of manioc in the Active Germplasm Bank of Embrapa Western Amazonia using microsatellite markers. Accessions collected in Amazons represent different river basins: Solimões, Purus, Madeira, Negro and Amazon Rivers. The ten loci showed high levels of genetic diversity, polymorphism information content (PIC) ranged from 0.38 to 0.84 and mean alleles per locus

was 11.3. The accessions of the Madeira River presented higher index of Shannon (1.52), as well as the largest number of private (19) alleles. The Bayesian analysis implemented by STRUCTURE determined that $K = 2$ was the one that best matches the structure of differentiation between sweet and bitter manioc varieties.

Key words: germoplasm; accessions; molecular characterization; geographic structuring; sweet and bitter manioc.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é, atualmente, a quinta cultura mais importante em produção de alimentos no mundo, principalmente na região tropical, e serve como alimento básico para mais de 800 milhões de pessoas (Lebot, 2009; FAO, 2012). Entre todos os cultivos, ela é apontada por diversos estudos científicos como o de maior eficiência biológica como produtor de energia e o de melhor adaptação a solos deficientes em nutrientes. No Brasil, a raiz da mandioca é utilizada principalmente na produção de farinha. O Brasil aparece entre os três maiores produtores da cultura (FAO, 2012) e a região Norte ocupa a segunda posição em produção nacional, sendo uma das principais fontes de renda regional (IBGE, 2013). Após a domesticação no sudoeste da Amazônia, as mandiocas cultivadas sofreram pressões seletivas divergentes que deram origem a dois grupos de variedades - amargas (mandioca) e mansas (macaxeira) - de acordo com maior ou menor teor de ácido cianídrico (HCN), respectivamente (Fukuda *et al.* 2006; McKey *et al.* 2010).

A cultura da mandioca é uma das mais antigas no país. A agricultura tradicional praticada pela maioria dos agricultores mantém ou até aumenta a diversidade genética por meio do cultivo de diferentes variedades de mandioca (Ferguson *et al.* 2011), assim como por meio do intercâmbio informal de manivas entre agricultores. Em função da importância da cultura para alimentação foram criados e vem sendo mantidos bancos de germoplasma (Silva *et al.* 2001) para apoiar programas de melhoramento em várias regiões brasileiras. Portanto, avaliar a diversidade agro-morfológica e genética do germoplasma de mandioca é importante

para o conhecimento da extensão da variabilidade genética, que é pré-requisito para sua utilização no melhoramento genético da espécie.

A variação molecular vem sendo muito analisada em coleções de germoplasma de espécies vegetais, tanto para complementar caracterização existente como para responder a questões sobre as relações genéticas do germoplasma (Sousa *et al.* 2009). Os marcadores microssatélites possuem uma importante vantagem sobre os demais, devido a sua codominância (Kalia *et al.* 2011), o que os tornam mais informativos para a caracterização genética de espécies cultivadas, como camu-camu (Rojas *et al.* 2011) e amendoim (Ren *et al.* 2014). Nos últimos anos, os marcadores microssatélites foram utilizados em vários estudos de diversidade genética em mandioca no Brasil (Siqueira *et al.* 2011; Mühlen *et al.* 2013; Costa *et al.* 2013).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade genética de 470 acessos de mandioca do Banco Ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Ocidental utilizando marcadores microssatélites, a fim de avaliar o grau de variabilidade genética da mandioca no BAG e também comparar a diversidade genética entre e dentro das bacias hidrográficas Amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Foram avaliados 470 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental. Os acessos são oriundos de 46 localidades de cinco calhas da bacia amazônica; Rio Solimões, Purus, Madeira, Negro e Baixo Amazonas. O Estado do Amazonas contribuiu com o maior número de acessos oriundos de 36 localidades (Figura 1), Acre contribuiu com duas, Pará 32, Rondônia quatro, Amapá uma, e 57 acessos não possuem informações sobre sua procedência. O BAG contém também 19 variedades melhoradas introduzidas da Bahia. O BAG está parcialmente caracterizado quanto ao teor de ácido cianídrico (HCN), com 185 acessos categorizados, sendo 111 mandiocas amargas e 75 mandiocas mansas.

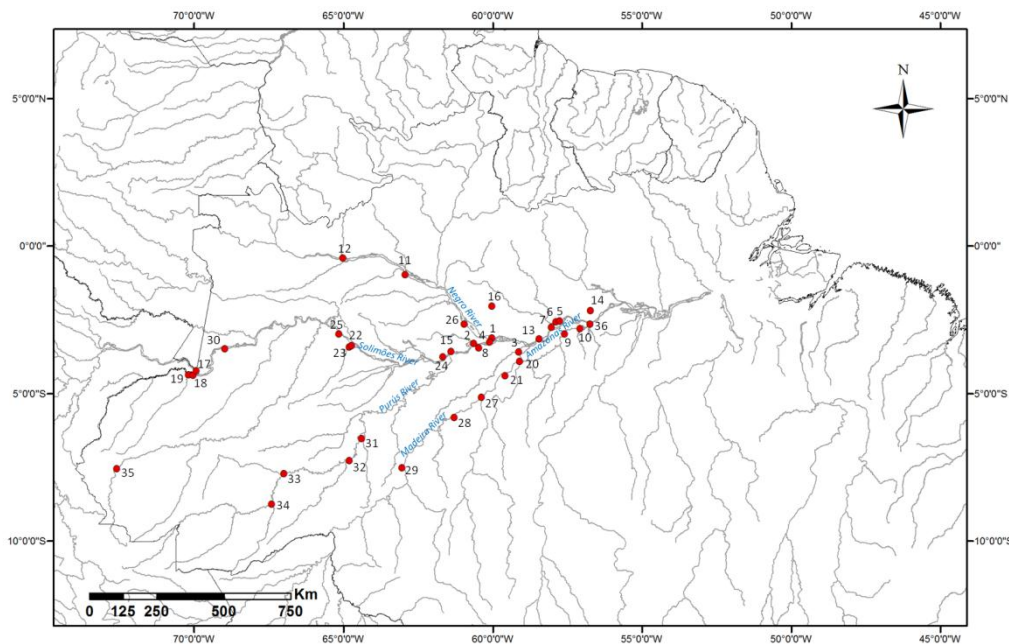


Figura 1: Mapa com as 36 localidades do Amazonas que contribuíram com acessos para o Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas: 1- Manaus, 2- Manaquiri, 3- Autazes, 4- Iranduba, 5- Urucará, 6- Itapiranga, 7- São Sebastião do Uatumã, 8- Manacapuru, 9- Boa Vista do Ramos, 10- Barreirinha, 11- Barcelos, 12- Santa Isabel do Rio Negro, 13- Itacoatiara, 14- Nhamundá, 15- Anamã, 16- Presidente Figueiredo, 17- Tabatinga, 18- Benjamin Constant, 19- Atalaia do Norte, 20- Nova Olinda do Norte, 21- Borba, 22- Tefé, 23- Alvarães, 24- Anori, 25- Uarini, 26- Novo Airão, 27- Novo Aripuanã, 28- Manicoré, 29- Humaitá, 30- São Paulo de Olivença, 31- Canutama, 32- Lábrea, 33- Pauini, 34- Boca do Acre, 35- Guajará, 36- Parintins.

EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DOS MICROSSATÉLITES

O DNA genômico total foi extraído a partir de amostras de folhas utilizando o protocolo de extração com o detergente catiônico CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1987) no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop) e em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, para verificar a concentração e nível de pureza.

Foram utilizados sete loci de microssatélites (GAGG5, GA12, GA126, GA131, GA134, GA136, GA140) descritos por Chavarriaga-Aguirre *et al.* (1998) e três (SSRY13, SSRY89, SSRY164) descritos por Mba *et al.* (2001) em *Manihot esculenta* (Tabela 2). As

reações em cadeia da polimerase foram preparadas para um volume final de 15uL contendo 0,4mM dNTPs, 0,2uM - 0,3uM de cada *primer*, 1X de tampão com Mg⁺ (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9.0 at 25°C), 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (GenScript) e 50ng de DNA. Amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems), com desnaturação inicial de 94°C por 3minutos, seguidos de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C- 61°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 30 minutos. A qualidade dos fragmentos foi verificada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Cada *primer forward* foi marcado com fluorescência FAM permitindo a análise por meio de eletroforese capilar em analisador genético modelo 3500 (Applied Biosystems), usando GeneScan™ 600 LIZ como marcador interno para inferir o tamanho dos alelos, e os dados foram analisados utilizando o software GeneMapper v 4.1(Applied Biosystems).

ANÁLISE DOS DADOS

Os parâmetros de diversidade genética (Nei, 1987), número de alelos (A), a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) foram estimados utilizando o programa ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). O conteúdo de informações polimórficas (PIC), a presença de alelos nulos e o índice de identidade genética foram calculados com o programa Cervus v 3.0 (Kalinowski *et al.* 2007) e o índice de fixação (F) pelo programa GenAlex 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). As frequências alélicas foram estimada com auxílio do programa CONVERT (Glaubitz, 2004).

A dispersão dos acessos de mandioca de acordo com os dados de diversidade dos marcadores microssatélites foi realizada por Análise de Coordenadas Principais (PCoA) usando o GenAlex 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). O programa STRUCTURE v.2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para inferir o número de agrupamentos que melhor se ajusta aos genótipos com base em valores de ΔK obtidos usando o método descrito por Evanno *et al.* (2005). Para cada número K de agrupamentos, com K variando de 1 a 10, foram realizadas 20 simulações, com o modelo sem informações prévias (*no prior population information*) considerando o modelo de mistura com frequência alélicas correlacionadas (*admixture model*, que pressupõe a existência de fluxo gênico entre as amostras), com 100000

iterações da cadeia Markov Monte Carlo (MCMC) e um período de *burn in* com 200000 iterações.

O dendrograma foi gerado no programa MEGA v6 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando como método de agrupamento *neighbor-joining*, a partir da matriz de distância genética entre os 470 acessos (Nei *et al.*, 1983) calculada no POPULATIONS V 1.2.32 (Langella, 1999).

RESULTADOS

Os dez loci de SSR de mandioca apresentaram altos índices de diversidade genética para os acessos de mandioca pertencentes ao BAG da Embrapa Amazônia Ocidental. Um total de 113 alelos foram detectados, com uma média de 11,3 por loco, com mínimo de quatro e máximo de 21 alelos (Tabela 1). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,38 a 0,84; o maior valor de PIC foi encontrado para o loco GA 131, o qual apresentou o maior número de alelos (Tabela 1). Nos resultados das análises de identidade realizada no programa Cervus foi detectado um total de 90 acessos idênticos, ou seja 19% do banco de germoplasma de mandioca.

Tabela 1: Características dos 10 loci de SSR analisados em 470 acessos do BAG, incluindo temperatura de anelamento (Ta), Amplitude em pares de base (Am), número de alelos por loco (A), Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (HE), Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC).

Loci	Ta	Am(pb)	A	Ho	HE	PIC
GAGG5 ¹	60°	114-123	6	0.519	0.512	0.438
GA12 ¹	59°	131-142	9	0.581	0.794	0.764
GA126 ¹	60°	176-214	14	0.738	0.832	0.816
GA131 ¹	59°	92-123	21	0.787	0.864	0.848
GA134 ¹	58°	307-325	4	0.395	0.417	0.355
GA136 ¹	59°	139-153	10	0.589	0.692	0.653
GA140 ¹	58°	146-169	9	0.723	0.782	0.748
SSRY13 ²	58°	192-236	20	0.457	0.848	0.835
SSRY89 ²	58°	98-118	5	0.173	0.422	0.385
SSRY164 ²	60°	152-184	15	0.490	0.680	0.680
Média			113	0.545	0.684	0.652

¹Primers desenvolvidos por Chavarriaga-Aguirre *et al.* (1998); ²Primers desenvolvidos por Mba *et al.* (2001)

A estruturação genética das 470 acessos utilizando a análise bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE mostrou o pico mais alto em $K = 2$, com considerável sub-estrutura em $K = 3$, $K = 5$ e em $K = 7$ (Figura 2). Os dois agrupamentos em $K = 2$

correspondem aproximadamente aos grupos de acessos de mandioca amarga e macaxeiras. O grupo um foi formado de 135 acessos, sendo 29 mandiocas, 55 macaxeiras e 51 acessos sem informação sobre HCN, com um grau de acerto que 73% dos acessos com informação sobre HCN foram corretamente atribuídas ao grupo, enquanto o grupo dois reuniu 247 acessos, 50 mandiocas, 13 macaxeiras e 184 acessos sem informação. Os acessos que tiveram fidelidades estimadas menores que 80% foram atribuídas a um grupo *admixture*, totalizando 88 acessos sendo 14 macaxeiras, 38 mandiocas e 26 sem informação de HCN. (Figura 3). Em $K = 5$, apenas um agrupamento corresponde as macaxeiras, porém sem nenhum padrão para as mandiocas. Em $K = 7$, em dois grupos predominam macaxeiras, sendo um bem estruturado com nove dos 13 acessos de macaxeiras e dois para mandiocas. Em $K = 3, 5, 7$ não foram identificados grupos geográficos interpretáveis (Figuras não mostradas).

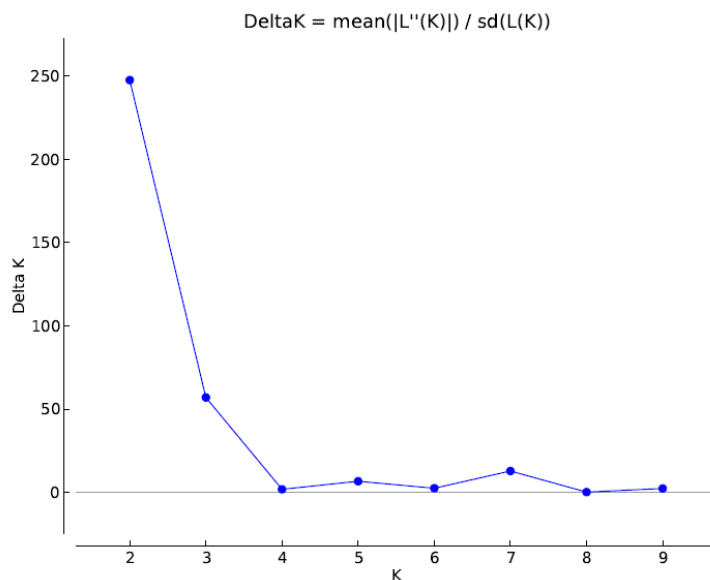


Figura 2: Valores de ΔK de possíveis dois grupos, de acordo com o método de Evanno *et al* , 2005 para 470 acessos de germoplasma de mandioca do BAG da Embrapa com 20 simulações com o Structure sem informação a priori.

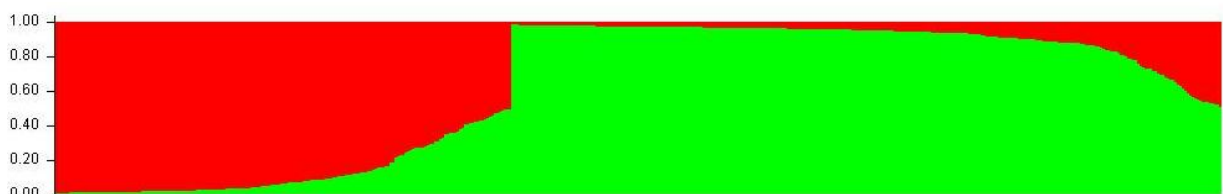


Figura 3: Análise de agrupamento pelo Structure dos 470 acessos de mandioca do BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental com $k = 2$ grupos, ordenado de acordo com o valor de $Q (> 80\%)$ de probabilidade, em vermelho grupo predominante de macaxeiras e verde de mandiocas.

A dispersão da variabilidade genética das análises de coordenadas principais (PCoA) de acordo com os grupos identificados por STRUCTURE foi a que melhor separou os acessos de mandiocas amargas das mansas (Figura 4A). No PCoA considerando os dados de classificação dos acessos por teor de HCN a discriminação entre brava e mansa foi muito menos clara (Figura 4B). A variação total explicada pelas duas primeiras coordenadas principais foram semelhantes: 23,36 e 23,87, respectivamente.

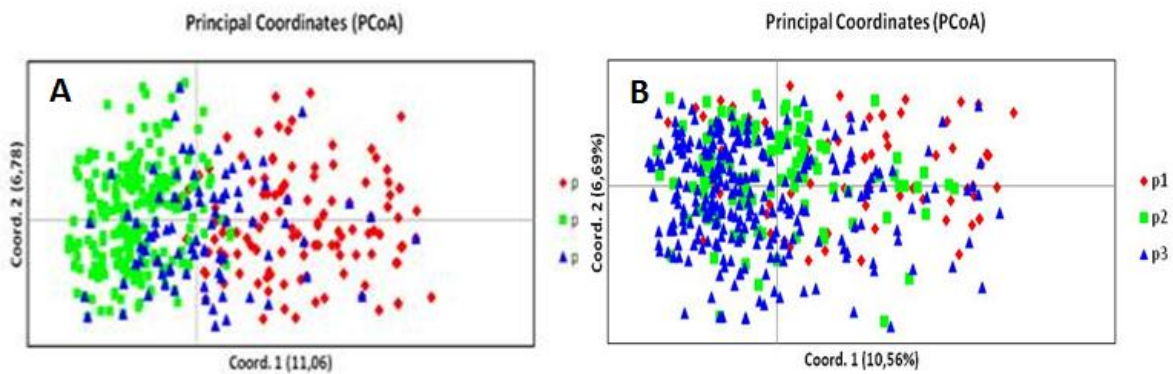


Figura 4: Representação gráfica da análise de coordenadas principais (PCoA) dos 470 genótipos de mandioca mantidas no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental, avaliados com marcadores moleculares SSRs. **A-** os grupos identificados por STRUCTURE (vermelho - grupo predominante de macaxeiras, verde – grupo predominante de mandiocas, azul - grupo *admixture*); **B-** plantas com HCN caracterizado (vermelho - macaxeiras, verde – mandiocas, azul - não caracterizados).

No geral, os parâmetros de diversidade genética para os grupos definido pelo STRUCTURE foram aproximados, a média de heterozigosidade observada foi de 0,53 a 0,55 e de 0,64 a 0,66 para heterozigosidade esperada. A maior estimativa do índice de fixação foi de 0,18 foi para o grupo 3 (*admixture*), e no grupo 2 foi encontrado o maior número de alelos privados (19 alelos) (Tabela 2). Os mesmos parâmetros foram calculados para os grupos referentes as calhas hidrográficas, e a maior média de heterozigosidade observada foi de 0,57 e para esperada foi de 0,71. O maior índice de fixação foi no grupo do Rio Negro (0,22) e de Shannon foi no Rio Madeira (1,52), assim como o maior número de alelos privados (Tabela 3).

Tabela 2: Parâmetros de diversidade genética (Nei, 1987) de mandioca mantido no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental para os grupos identificados por Structure a $k=2$ e os acessos *admixture* Q ($< 0,80\%$ Grupo 3). No Grupo 1 as mandiocas mansas predominam, enquanto que no Grupo 2 as mandiocas amargas predominam.

GRUPOS	N	Na	Ap	Ho	He	F	I
Grupo 1	135	7,2	3	0,53	0,65	0,17	1,33
Grupo 2	247	10,1	19	0,55	0,64	0,11	1,43
Grupo 3	88	8,7	6	0,55	0,66	0,18	1,46

N- Número de acessos, Na- média Número de alelos, Ap- Alelos privados, Ho – média de Heterozigosidade observada, He- média de Heterozigosidade esperada, F- média do Índice de Fixação, I- media do Índice de Shannon.

Tabela 3: Parâmetros de diversidade genética (Nei, 1987) de mandioca mantido no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental com as variedades agrupadas por calha hidrográfica do Estado do Amazonas.

Calhas Hid.	N	Na	Ap	Ho	He	F	I
1-Rio Solimões	113	8,2	2	0,51	0,66	0,21	1,41
2-Rio Purus	18	6,6	1	0,57	0,65	0,14	1,38
3-Rio Madeira	122	9,6	6	0,57	0,69	0,17	1,52
4-Rio Negro	20	6,6	1	0,56	0,71	0,22	1,50
5-Rio Amazonas	114	8,3	5	0,53	0,65	0,16	1,42
6-Sem id. de calha	88	8,6	2	0,55	0,68	0,21	1,49
Geral	470	113	17	0,55	0,67	0,18	1,45

N- Número de Acessos, Na- Média Número de alelos, Ap- Alelos privados, Ho- média de Heterozigosidade observada, He- média de Heterozigosidade esperada, F- média do Índice de Fixação e I-média do Índice de Shannon.

No dendrograma utilizando o algoritmo de neighbor-joining e a distância genética de Nei (1983) entre os 470 acessos de mandioca não foi possível identificar estruturação relacionada as variedades de mandioca amarga e mansa, nem referente as calhas hidrográficas (Figura 5).

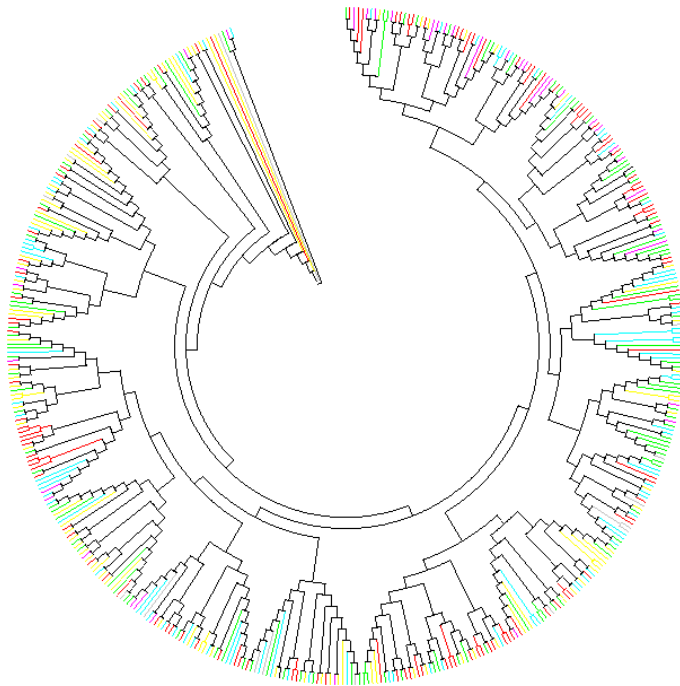


Figura 5: Agrupamento dos 470 acessos de mandioca representado no dendrograma usando o algoritmo de neighbor-joining e distância genética de Nei (1983) estimadas com 10 loci de SSR. Cada acesso é representado por um ramo, colorido com base nas calhas hidrográficas: amarelo - Rio Amazonas; verde - Rio Solimões; vermelho - Rio Madeira; rosa - Rio Negro; cinza - Rio Purus; e azul - Sem identificação.

DISCUSSÃO

Nós observamos altos índices de diversidade genética no BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental, similares aos estudos de Siqueira *et al.* (2010); Mühlen *et al.* (2013) e Costa *et al.* (2013). A média de alelos por loci foi de 11,3 e a média de heterozigosidade observada de 0,54. Siqueira *et al.* (2011) analisaram 83 acessos de mandioca com nove loci, seis usados neste estudo, e encontraram uma média de 3,5 de alelos por loco, com 97% de loci polimórficos, e média de heterozigosidade observada de 0,32; ambos os parâmetros foram menores que os encontrados no Estado do Amazonas possivelmente porque a amostragem de Siqueira *et al.* foi geograficamente restrita. Mühlen *et al.* (2013), com nove loci dos quais seis usados aqui, analisaram 494 variedades e encontraram uma média de 9,9 de alelos por loco e uma média de heterozigosidade observada de 0,59; os parâmetros de Mühlen *et al.* foram mais similares ao do Estado do Amazonas porque sua amostragem foi de tamanho similar embora com distribuição geográfica maior. Avaliando 66 variedades de macaxeira,

Costa *et al.* (2013), usando 13 loci dos quais quatro usados neste estudo, encontraram uma média de 2,53 de alelos e 0,55 de heterozigidade observada.

A priori havíamos esperado alguma estruturação geográfica porque o intercambio de manivas ocorre mais entre vizinhos do que entre pessoas em outras calhas (Emperaire e Peroni, 2007). Os padrões de distribuição da diversidade genética dos acessos de mandioca reveladas pelo STRUCTURE demonstraram uma falta de correlação com a origem geográfica. Em escala local, como no estudo de Costa *et al.* (2013) ao redor de Maringá, Paraná, a falta de estruturação geográfica é menos surpreendente. Na escala amazônica, Mühlen *et al.* (2013) haviam detectado uma diferenciação entre o alto rio Negro e o resto da região, mas foi o grupo identificado por STRUCTURE com menor ΔK . O pequeno número de acessos do rio Negro em nosso estudo é certamente a razão que não detectamos algo similar.

A variação no teor de ácido cianídrico (HCN) entre os acessos de mandioca brava e mansa em nosso estudo é menos clara que em outros estudos (Peroni *et al.* 2007; Mühlen *et al.* 2013). A diferença entre os grupos identificados pelo STRUCTURE em $K = 2$ (Figura 4a) e o padrão de dispersão dos acessos caracterizados em termos de HCN (Figura 4b) sugere que o BAG Mandioca requer um novo esforço para caracterizar uniformemente os acessos.

CONCLUSÕES

O BAG Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental contém abundante diversidade genética, como esperada de uma coleção desta magnitude. A diferenciação entre os grupos dos acessos de mandiocas amargas e mansas foi menos clara do que em estudos anteriores, sugerindo a necessidade de um novo esforço para analisar HCN no BAG. Os genótipos das calhas hidrográficas melhor amostradas contêm maior diversidade genética, certamente devido ao maior esforço de coleta. A ausência de estruturação geográfica sugere que o intercâmbio de manivas é mais importante do que reconhecido anteriormente.

REFERÊNCIAS

- Chavarrriaga-Aguirre, P.; Maya, M. M.; Bonierbale, M. W.; Kresovich, S.; Fregene, M. A.; Tohme, J.; Kochert, G. 1998. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 493–501.
- Costa, T. R. da; Filho, P. S. V; Vidigal, M. C. G; Galván, M. Z; Lacanallo, G. F; Silva, L. I. da; Kvitschal, M. V. 2013. Genetic diversity and population structure of sweet cassava using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. *African Journal of Biotechnology*, 12(10), pp. 1040-1048.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1: 13-15.
- Emperaire, L.; Peroni, N. 2007. Traditional management of agrobiodiversity in Brazil: A case study of manioc. *Human Ecology*, 35(6): 761-768.
- Evanno, G.; Regnault, S.; Gaudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- FAO. 2012. *Second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Ferguson, M.E; Jones, R.B; Bramel, P.J; Domínguez, C; Torre do Vale, C; Han, J. 2011. Post-flooding disaster crop diversity recovery: a case study of cowpea in Mozambique. *Disasters*. doi: 10.1111/j.1467- 7717.2011.01242.x.
- Fukuda, W. M. G.; Fukuda, C.; Dias, M. C.; Xavier, J. J. B. N.; Fialho, J. F. 2006. Variedades. In: Souza, L. S. *Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 433-454.

- Glaubitz, J. C. 2004. CONVERT: A user- friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4: 309-310.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Agrícola. Disponível em (www.sidra.ibge.gov.br). Acesso em março de 2013.
- Kalia, R. K.; Rai, M. K.; Kalia, S.; Singh, R.; Dhawan, A. K. 2011. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177: 309–334.
- Kalinowski, S. T; Taper, M. L; Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099-1006.
- Langella O (1999). Populations, 1.2.32. Available at [<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations>]. Accessed April, 2015.
- Lebot, V. 2009. *Tropical roots and tuber crops: Cassava, sweet potato, yams and aroids*. CAB International, Oxford, UK.
- Mba, R.; Stephenson, P.; Edwards, K.; Melzer, S.; Nkumbira, J.; Gullberg, U.; Apel, K.; Gale, M.; Tohme, J.; Fregene, M. 2001. 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*, 102: 21–31.
- McKey, D.; Cavagnaro, T. R.; Cliff, J.; Gleadow, R. 2010. Chemical ecology in coupled human and natural systems: people, manioc, multitrophic interactions and global change. *Chemoecology*, 20: 109–133.
- Mühlen, G. S.; Pereira, A. A.; Clement, C. R.; Valle, T. L. 2013. Genetic diversity and differentiation of Brazilian bitter and sweet manioc varieties (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) based on SSR molecular markers. *Tipiti: Journal of the Society for the Anthropology of Lowland South America*, 11(2), Art. 8.
- Nei, M.; Tajima, F.; Tatenno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153 –170.

- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Peakall, R.; Smouse, P. E. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Peroni, N.; Kageyama, P.; Begossi, A. 2007. Molecular differentiation, diversity, and folk classification of "sweet" and "bitter" Cassava (*Manihot esculenta*) in Caiçara and Caboclo management systems (Brazil). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1333-1349.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Ren, X.; Jiang, H.; Yan, Z.; Chen, Y.; Zhou, X.; Huang, L. *et al.* 2014. Genetic diversity and population structure of the major peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown in China by SSR markers. PLoS ONE 9(2): e88091. doi:10.1371/journal.pone.0088091.
- Rojas, S.; Yuyama. K.; Nagao, E. O. 2011. Diversidade genética em acessos do banco de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.K.] McVaugh) do INPA usando marcadores microssatélites (EST-SSR). *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(1), 51-64.
- Silva, R. M.; Bandel, G.; Faraldo, M. I. F.; Martins, P. S. 2001. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. *Scientia Agrícola*. 58(1), p.101-107.
- Siqueira, M. V. B. M.; Borges, A.; Valle, T. L.; Veasey, E. A. 2011. A comparative genetic diversity assessment of industrial and household Brazilian cassava varieties using SSR markers. *Bragantia*, 70(4): 745-752.
- Sousa, N. R.; Filho, F. J. do N.; Souza, A. das G. C. 2009. Caracterização, avaliação e documentação de recursos genéticos de espécies amazônicas. In: Borém, A.; Lopes, M. T. G.; Clement, C. R. (Eds) *Domesticação e Melhoramento: espécies amazônicas* –Viçosa, MG, 486p.
- Tamura, K; Stecher, G; Peterson, D; Filipski, A; Kumar, S .2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Ev.* 30: 2725-2729.

Sousa, S. B.; Clement, C. R.; Sousa, N. R. 2014.

Desenho de uma coleção nuclear no banco ativo de germoplasma de mandioca na Embrapa Amazônia Ocidental

Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*.

Desenho de uma coleção nuclear no banco ativo de germoplasma de mandioca na Embrapa Amazônia Ocidental

Sandra BARBOSA DE SOUSA¹, Charles R. CLEMENT¹, Nelcimar REIS SOUSA²,

¹Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

²Embrapa Amazônia Ocidental

RESUMO

A mandioca cultivada possui duas variedades, a mandioca brava e a mansa; a diferença fundamental entre as duas variedades é o maior ou menor teor de ácido cianídrico. Em função da importância da cultura a Embrapa Amazônia Ocidental mantém em condições de campo 470 acessos no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca. Porém, o elevado número de amostras mantidas nos bancos dificulta a sua caracterização, avaliação e a manutenção. A formação de uma coleção nuclear de mandioca deve contribuir para reduzir o número de duplicatas, minimizar os custos com a sua manutenção no campo e torná-la mais representativa. Uma coleção nuclear de mandioca foi proposta usando-se o software Powercore 1.0, com base em dados de marcadores microssatélites. Selecionado os acessos com maior diversidade de alelos, foi desenhada uma coleção nuclear com 56 acessos, representando cerca de 12% do banco de germoplasma de mandioca, capturando 100% dos alelos estudados. A heterozigosidade observada foi de 0,54 tanto no BAG quanto na CN. A CN, portanto, foi constituída de acessos de 14 mandiocas amargas e quatro mansas com representação de todas as bacias hidrográficas da Amazônia.

Palavras-chave: Marcadores microssatélites, riqueza alélica, variabilidade genética.

ABSTRACT

Cultivated manioc has two groups of varieties, the bitter and the sweet; the fundamental difference between the two varieties is higher or lower hydrocyanic acid content. Because of the importance of the crop, Embrapa Western Amazonia maintains 470 accessions in the Active Germplasm Bank, a field collection. The high number of accessions held in the bank

complicates characterization, evaluation and maintenance. The formation of a core collection of manioc should contribute to reducing the number of duplications, minimize the cost of its maintenance in the field and make it more representative. The manioc core collection was designed using Powercore 1.0 software and data from microsatellite markers. The core collection has 56 accessions, representing about 12% of the manioc germplasm bank, capturing 100% of the alleles studied. The observed heterozygosity was 0.54 in both germplasm bank and core collection. The CN, therefore, was constituted of accesses of 14 manioc bitter and four sweet manioc ones with representation of all the hydrographic basins Amazonia.

Key words: microsatellite molecular marker, allelic richness, genetic variability.

INTRODUÇÃO

A mandioca cultivada (*Manihot esculenta* Crantz, ssp *esculenta*) constitui uma das principais fontes de alimentos nos trópicos. Seu centro de domesticação está localizado no sudoeste da Amazônia, entre os estados de Rondônia, Mato Grosso e leste do Acre no Brasil, e nordeste da Bolívia (Schaal *et al.*, 2006). A espécie possui duas variedades de mandioca, brava e mansa (macaxeira), que não se distinguem por caracteres morfológicos, porém a diferença fundamental entre as duas variedades é o maior ou menor teor de ácido cianídrico. De ampla adaptação, a mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, destacando a Bahia e o Pará como os maiores produtores (IBGE, 2013).

Na Amazônia, a cultura é disseminada entre populações tradicionais de agricultores familiares ao longo das calhas dos grandes rios e tributários por meio da troca de manivas reconhecidas por nomes locais. A Embrapa Amazônia Ocidental mantém, desde 1994, em condições de campo acessos que foram coletados em diversas localidades da bacia amazônica, principalmente no Estado do Amazonas, formando o Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca. A sinonímia observada entre variedades de mandioca eleva os índices de duplicatas no germoplasma (Silva *et al.*, 1992), onde variedades iguais com denominações diferentes são coletadas mais de uma vez.

Apesar da mandioca ser propagada vegetativamente, ela conservou a reprodução sexuada, promovendo a amplificação da variabilidade genética (Silva *et al.*, 2001). A variação

gerada nas roças dos mandiocultores serve como fonte de enriquecimento para os bancos de germoplasma da espécie. Os objetivos fundamentais da conservação de germoplasma são adquirir, manter, documentar, avaliar e tornar acessível uma amostra representativa da diversidade genética de plantas cultivadas (Bonow, 2007; Nass, 2007). Porém, o manejo e a utilização da diversidade mantida nas coleções de germoplasma são os principais desafios enfrentados por curadores de germoplasma e melhoristas (Upadhyaya *et al.*, 2011). O número elevado de amostras demandam mais recursos financeiros, o que dificulta a caracterização, avaliação e a manutenção do germoplasma, principalmente para espécies propropagadas vegetativamente e mantidas em campo. A indisponibilidade de informações específicas do germoplasma representa uma restrição para utilização de recursos genéticos (FAO, 2010).

A construção de uma coleção nuclear é uma opção estratégica para aumentar a utilização do germoplasma. A coleção nuclear (CN) é definida por um conjunto reduzido de acessos oriundos de uma coleção de germoplasma, escolhidos para representar a variabilidade genética com o mínimo de repetitividade (Brown e Spillane, 1999).

Existem diferentes métodos descritos para desenvolver uma coleção nuclear que combinam teoria básica de amostragem com os avanços nos programas de análises utilizando marcadores moleculares. Quando os acessos estão agrupados pela origem e não existem informações sobre caracteres agromorfológicos ou moleculares, as estratégias de amostragem constante (C), proporcional (P) e logarítmica (L) podem ser usadas, como uma proporção relativa ao tamanho dos grupos e como uma proporção do algoritmo do tamanho de cada um dos grupos (van Hintum *et al.*, 2000). Para dados moleculares, as estratégias Heterozigosidade (H) e Maximização (M) são mais eficazes. A estratégia H maximiza o número de alelos na coleção através da amostragem de acessos em cada um dos grupos, de forma proporcional a diversidade genética dentro deles. A estratégia M, apesar de ser derivada da H, é mais robusta, pois se utiliza de simulações de Monte Carlo para selecionar os indivíduos; assim, a partir de todas as possíveis coleções, aquela com maior riqueza alélica ou menor presença de desequilíbrio de ligação será candidata final (Gouesnard *et al.* 2001). Atualmente a estratégia M avançada é uma das mais utilizadas para formação de coleções nucleares (Sun *et al.*, 2011; Belaj *et al.*, 2012; Khain *et al.*, 2013; Balas *et al.*, 2014).

A formação de uma coleção nuclear de mandioca deve contribuir para redução do número de duplicatas, minimizar os custos com a sua manutenção no campo e torná-la mais

representativa para utilização na pesquisa. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenhar uma coleção nuclear dentro do Banco Ativo de Germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental usando dados de marcadores moleculares.

MATERIAL E METÓDOS

Material vegetal

A Embrapa Amazônia Ocidental mantém 470 acessos de mandioca em campo, dos quais são 75 macaxeiras e 185 mandiocas; as demais ainda não foram analisadas em termos de teor de ácido cianídrico (HCN). Em termos das informações de passaporte referentes as coordenadas geográficas, 113 são oriundas do Rio Solimões, 18 do Rio Purus, 122 do Rio Madeira, 20 do Rio Negro, 114 do baixo Rio Amazonas, e as demais oriundas de outros Estados ou que não possuem nenhuma informação geográfica (Apêndice 1). No BAG contém também 19 acessos melhorados introduzidos da Bahia, e todos foram usados nas análises. Os 470 acessos foram genotipadas com 10 loci SSR (Sousa *et al.*, capítulo 1).

Desenvolvimento da coleção nuclear (CN)

O desenho da coleção nuclear de mandioca foi implementado pelo software Powercore 1.0, que aplica a estratégia M avançada utilizando um algoritmo heurístico modificado para estabelecer a CN (Kim *et al.*, 2007). O tamanho final da CN não é conhecido a priori, e depende dos níveis de variabilidade e redundância presente na coleção inteira. Inicialmente, os dados de genotipagem de todos os loci foram automaticamente organizados em uma tabela de frequência representando toda a coleção. Em sequência foram selecionados os acessos com maior diversidade alélica que representam a cobertura de todos os alelos.

A representatividade da CN foi avaliada por comparação de parâmetros estimados por dados gerados pela genotipagem dos 10 loci de SSR considerando dois grupos: Banco Ativo de Germoplasma (BAG) e a Coleção Nuclear (CN). Os parâmetros de diversidade genética (Nei, 1987), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade observada (H_o), esperada (H_e), Índice de Shannon, e frequências dos alelos foram calculados no GenAlex 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). A riqueza alélica foi determinada no FSTAT v 1.2 (Goudet, 1995). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada utilizando 10.000 permutações aleatórias e o

número de alelos privados capturados pela CN foram analisados no GenAlex 6.5 (Peakall e Smouse, 2012).

RESULTADOS

A CN desenhada pelo software Powercore foi composta de 56 acessos (11,91% dos 470 acessos do BAG), com a cobertura de todos os 113 alelos com os 10 loci de microssatélites. Todos os índices de diversidade analisados na CN tiveram valores aproximados ou superiores ao do BAG, indicando que não houve perda de informação na formação da CN. A heterozigosidade esperada foi de 0,68 no BAG e 0,72 na CN, e o índice de Shannon também foi maior na CN do que no BAG (Tabela 1). Os coeficientes da riqueza alélica calculados por loco também mostraram níveis superiores na CN do que no BAG (Tabela 2). As frequências alélicas dos marcadores microssatélites na coleção nuclear também foram significativamente correlacionados ($r = 0,95$) com as frequências observadas no BAG (Figura 1).

Tabela 1: Média dos parâmetros de diversidade genética no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental e na Coleção Nuclear desenhada com apoio do Powercore, onde Número total de alelos (Na), Heterozigosidade Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_E), Índice de Shannon (I) e Desvio Padrão (\pm).

	N	Na	H_o	H_E	I
BAG	470	11,3 \pm 1,95	0,54 \pm 0,06	0,68 \pm 0,05	1,53 \pm 0,18
CN	56	11,3 \pm 1,90	0,54 \pm 0,05	0,72 \pm 0,05	1,74 \pm 0,21

Tabela 2: Valores da riqueza alélica calculados para os dez loci de microssatélites, comparando Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca e Coleção Nuclear, inclusive os acessos da Bahia.

LOCI	BAG	CN
GAGG5 ¹	3.3	5.9
GA126 ¹	11.6	13.9
GA131 ¹	13.4	20.8
GA134 ¹	3.1	4.0
GA136 ¹	7.0	9.9
GA140 ¹	6.3	8.9
GA12 ¹	7.8	8.9
RY13 ²	13.5	19.9
RY89 ²	4.0	5.0
RY164 ²	6.9	14.7

¹Chavarriaga-Aguirre *et al.* (1998); ²Mba *et al.* (2001)

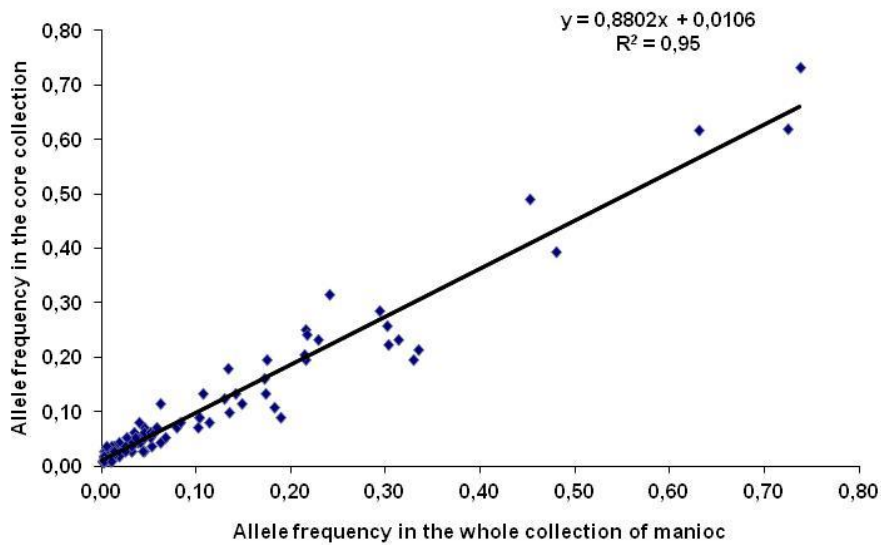


Figura 1: Distribuição de frequência dos 113 alelos capturadas na coleção nuclear (56 acessos) versus suas frequências no Banco Ativo de Germoplasma de Embrapa Amazônia Ocidental (470 acessos).

Pela análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que quase 100% da diversidade genética está dentro dos dois grupos formados pela CN e BAG, com menos de 1% entre os dois grupos (Tabela 3). Nos 56 acessos da coleção nuclear não foram encontrados alelos privados quando comparados ao BAG.

Tabela 3: Análise de variância molecular dos 414 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de mandioca e os 56 da Coleção Nuclear.

Fonte de Variação	GL	SS	MQ	Est. Var.	%
Entre Grupos	1	15,453	15,453	0,073	0,8810%
Dentro Grupos	468	3853,024	8,232	8,233	99,1189%
Total	469	4389,842		8,306	100%

GL- Graus de liberdade; SS- Soma dos quadrados; MQ- Média dos quadrados; Est. Var.-Estimativa de variância

Na CN proposta é possível observar que todas as regiões, inclusive as com menor representatividade no BAG, como as do Rio Negro e do Rio Purus, tiveram amostras incluídas, três e dois acessos, respectivamente (Tabela 4). Na representação gráfica está expressado visualmente os acessos selecionados para coleção nuclear pelo software em comparação a todos os acessos pertencente ao BAG (Figura 2).

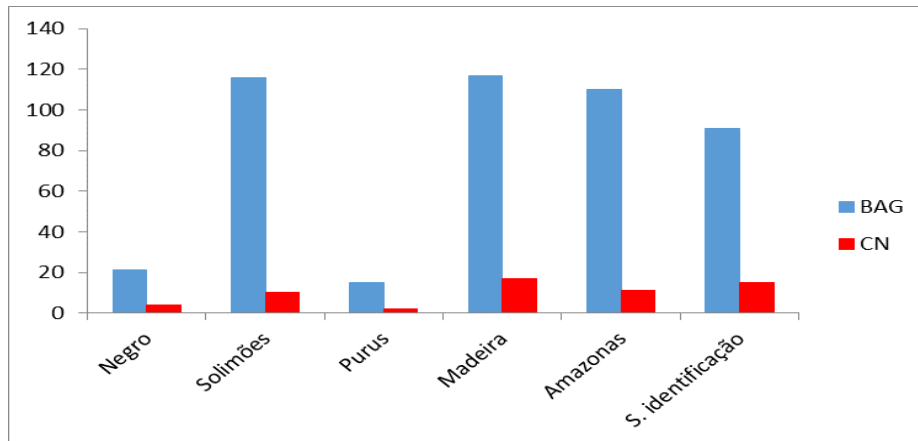


Figura 2: Representatividade das localidades/calhas de origem dos acessos no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (n = 470 acessos), Embrapa Amazônia Ocidental e na Coleção Nuclear (n = 56 acessos), escolhidas pela maximização de alelos com Powercore (Kim *et al.*, 2007).

Tabela 4: Lista dos 56 acessos selecionados para compor a Coleção Nuclear e suas identificações no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca, da Embrapa Amazônia Ocidental, com sua classificação (brava, mansa, sem informação) e localização geográfica por município e calha.

Im dos Acessos	Class	Localidades	Calhas	Im dos Acessos	Class	Localidades	Calhas
Im1654	SC	Itapiranga	Rio Amazonas	Im1077	Brava	Barcelos	Rio Negro
Im1713	SC	B.V. dos Ramos	Rio Amazonas	Im879	Brava	S.I.do R. Negro	Rio Negro
Im1735	SC	Nhamundá	Rio Amazonas	Im1076	Brava	Barcelos	Rio Negro
Im1749	SC	Faro	Rio Amazonas	Im1532	SC	Pauini	Rio Purus
Im1692	SC	Faro	Rio Amazonas	Im1542	Brava	Labrea	Rio Purus
Im1716	SC	B.V. do Ramos	Rio Amazonas	Im1980	Brava	Anori	Rio Solimões
Im1782	SC	Juruti	Rio Amazonas	Im1995	Brava	Anori	Rio Solimões
Im1785	SC	Itapiranga	Rio Amazonas	Im959	Brava	S. P. de Olivença	Rio Solimões
Im1789	SC	Itapiranga	Rio Amazonas	Im996	Mansa	B. Constant	Rio Solimões
Im1668	Brava	Humaitá	Rio Madeira	Im1957	SC	Irاندوبا	Rio Solimões
Im1680	Brava	Humaitá	Rio Madeira	Im1970	Brava	Anori	Rio Solimões
Im1821	Mansa	Humaitá	Rio Madeira	Im819	Brava	Uarini	Rio Solimões
Im1826	Mansa	Humaitá	Rio Madeira	Im1461	Mansa	SIL	SIC
Im1841	SC	Manicoré	Rio Madeira	Im1466	SC	AM	SIC
Im1844	SC	Manicoré	Rio Madeira	Im1628	Brava	Bahia	SIC
Im1845	SC	Manicoré	Rio Madeira	ImF507	SC	Bahia	SIC
Im1893	SC	Borba	Rio Madeira	Im296	SC	Bahia	SIC
Im1894	SC	Borba	Rio Madeira	Im1433	SC	Bahia	SIC
Im1922	SC	Borba	Rio Madeira	Im2040	SC	SIL	SIC
Im1933	Mansa	Nova Olinda	Rio Madeira	Im2051	SC	SIL	SIC
Im1936	SC	Nova Olinda	Rio Madeira	Im2057	SC	SIL	SIC
Im1938	SC	Nova Olinda	Rio Madeira	Im1928	SC	SIL	SIC
Im1128	Brava	Humaitá	Madeira	Im2037	SC	SIL	SIC
Im1695	Brava	Humaitá	Madeira	Im1817	SC	SIL	SIC

Im1839	SC	Manicoré	Madeira	Im183	SC	SIL	SIC
Im1848	SC	Manicoré	Madeira	Im2055	SC	SIL	SIC
Im1910	SC	Borba	Madeira	Im761	SC	SIL	SIC
Im1911	SC	Borba	Madeira	Im1687	SC	SIL	SIC

Class= Classificação quanto ao teor de HCN, Im= Identificação da mandioca/ macaxeira, SC= Sem classificação, SIL= Sem identificação de localidade, SIC= Sem identificação de Calha.

DISCUSSÃO

O tamanho da CN obtida por meio da estratégia M está dentro da média das coleções nucleares desenhadas recentemente com esta metodologia (Escribano *et al.* 2008; Studnicki *et al.* 2011, Belaj *et al.* 2012; Sun *et al.* 2012; Park *et al.* 2014). A coleção nuclear para o gênero *Amaranthus*, o algoritmo heurístico modificado com o programa Powercore resultou em uma CN com 63 acessos, representando 9,94% do total de acessos (Khain *et al.*, 2013).

A Coleção Nuclear do BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental contendo 56 acessos foi capaz de capturar o máximo de variação alélica (113) gerada por 10 loci de microssatélites em 470 acessos e representou todas as regiões hidrográficas. Escribano *et al.* (2008) testaram seis métodos para desenvolver a coleção nuclear de anona (*Annona cherimola*, Annonaceae), os autores concluíram que a estratégia M foi o método mais eficiente para desenvolver uma CN. Khain *et al.* (2013), na coleção nuclear definida pela estratégia de maximização capturou todos os 181 alelos detectados em toda coleção original. Belaj *et al.* (2012) desenvolveram conjuntos diferentes para representar a coleção nuclear de oliva (*Olea europaea* L.) a partir dos dados de diferentes marcadores moleculares e métodos de amostragens; pelo método de maximização, como usado aqui, a coleção gerada pelo software PowerCore reuniu 68 acessos (dos 361 acessos do BAG Oliva) e capturou 100% dos alelos para cada um dos marcadores analisados.

Na comparação entre CN versus BAG todos os parâmetros de diversidade genética foram semelhantes a estudos anteriores. O índice médio de diversidade de Shannon foi maior na CN de amaranto, porém os demais parâmetros e riqueza alélica por loco foram os mesmos nas duas coleções (Khain *et al.* 2013). Balas *et al.* (2013) compararam parâmetros de

variabilidade e encontraram diferenças significativas nos índices de heterozigosidade esperada e observada entre a CN e o Banco de germoplasma de figo (*Ficus carica* L.).

A distribuição das frequências alélicas dos dez loci de microssatélites na CN foi significativamente correlacionada com a do BAG ($r=0,99$). Coeficientes de correlação superiores a 0,90 foram obtidos nas CN de figo e amaranto, respectivamente $r= 0,99$ (Balas *et al.* 2013) e $r =0,92$ (Khain *et al.* 2013).

CONCLUSÕES

Apesar da eficiência do software Powercore em criar coleções nucleares com todos os alelos dos marcadores usados, vale lembrar que pequenos números de marcadores moleculares, especialmente os marcadores neutros, como os microssatélites, representam minúsculas frações dos genomas envolvidos. Com esta ressalva, a CN desenhada dentro do BAG Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental tem características similares às outras CN's desenhadas com este programa e serve como ponto de partida. O próximo passo é caracterizar morfo-agronomicamente os acessos propostos para a CN para determinar se possuem características morfológicas e agronômicas interessantes para utilização no programa de melhoramento.

REFERÊNCIAS

- Bakkali, A. E.; Haouane, H.; Moukhli, A.; Costes, E.; Damme, P. V.; Khadari, B. 2013. Construction of core collections suitable for association mapping to optimize use of Mediterranean Olive (*Olea europaea* L.) genetic resources. *PLoS ONE* 8(5): e61265. doi:10.1371/journal.pone.006126.
- Balas, F. C.; Osuna, M. D.; Domínguez, G.; Pérez-Gragera, F.; López-Corrales, M. 2014. Ex situ conservation of underutilised fruit tree species: establishment of a core collection for *Ficus carica* L. using microsatellite markers (SSRs). *Tree Genetics & Genomes*, online in advance of print. doi:10.1007/s11295-014-0715-3.
- Belaj, A.; Dominguez-García, M.; Atienza, S.; Martín Urdíroz, N.; De La Rosa, R.; Satovic, Z.; Martín, A.; Kilian, A.; Trujillo, I.; Valpuesta, V.; Del Río, C. 2012. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genetics & Genomes*, 8: 365–378.
- Bonow, S. 2007. Coleções nucleares em bancos de germoplasma: conceito e utilização atual em trigo. Passo Fundo: Embrapa trigo, 7p. (www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do80.htm). Acesso em 20/10/2012.
- Brown, A. H. D.; Spillane, C. 1999. Implementing core collections - principles, procedures, progress, problems and promise. In: Johnson, R. C.; Hodgkin, T. (Ed.). *Core collections for today and tomorrow*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp.1-9.
- Brown, A. H. D. 1989. The case for core collections. In: Brown, A. H. D. et al. (Ed.). *The use of plant genetic resources*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 136-156.
- Chavarriaga-Aguirre, P.; Maya, M. M.; Bonierbale, M. W.; Kresovich, S.; Fregene, M. A.; Tohme, J.; Kochert, G. 1998. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 493–501.
- Cordeiro, C. M. T.; Abadie, T. 2007. Coleções nucleares. In: Nass, L. L. (Ed.) *Recursos genéticos vegetais*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, pp.576-604.
- Escribano, P.; Viruel, M. A.; Hormaza, J. I. 2008. Comparison of different methods to construct a core germplasm collection in woody perennial species with simple sequence repeat markers. A case study in cherimoya (*Annona cherimola*, Annonaceae), an underutilised subtropical fruit tree species. *Annals of Applied Biology*, 153: 25–32.

- FAO. 2010. *Second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- Gouesnard, B.; Bataillon, T. M.; Decoux, G.; Rozale, C.; Schoen, D. J.; David, J. L. 2001. MSTRAT: an algorithm for building germplasm core collections by maximizing allelic or phenotypic richness. *Journal of Heredity*, 92: 93–94.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Agrícola. Disponível em (www.sidra.ibge.gov.br). Acesso em março de 2013.
- Khaing, A. A.; Moe, K. T.; Chung, J.-W.; Baek, H.-J.; Park, Y.-J. 2013. Genetic diversity and population structure of the selected core set in *Amaranthus* using SSR markers. *Plant Breeding*, 132: 165–173.
- Kim, K. W.; Chung, H. K.; Cho, G. T.; Ma, K. H.; Chandrabalan, D.; Gwag, J. G.; Kim, T. S.; Cho, E.G. ; Park, Y. J. 2007. PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing allele mining sets. *Bioinformatics*, 23: 2155–2162.
- Mba, R.; Stephenson, P.; Edwards, K.; Melzer, S.; Nkumbira, J.; Gullberg, U.; Apel, K.; Gale, M.; Tohme, J.; Fregene, M. 2001. 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*, 102: 21–31.
- Nass, L. L. 2007. *Recursos genéticos vegetais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 858 p.
- Odong, T. L.; Jansen, J.; van Eeuwijk, F. A.; van Hintum, T. J. L. 2013. Quality of core collections for effective utilisation of genetic resources: review, discussion and interpretation. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 289–305.
- Park, J.-H.; Suresh, S.; Cho, G.-T.; Choi, N.-G.; Baek, H.-J.; Lee, C.-W.; Chung, J.-W. 2014. Assessment of molecular genetic diversity and population structure of sesame (*Sesamum indicum* L.) core collection accessions using simple sequence repeat markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 12(1): 112–119.
- Peakall, R.; Smouse, P. E. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Schaal, B. A.; Olsen, K. M.; Carvalho, L. J. C. B. 2006. Evolution, domestication, and agrobiodiversity in the tropical crop cassava. In: Motley, T. J.; Zerega, N., Hughs, H. (Eds).

- Drawin`s harvest – New approaches to the origins, evolution, and conservation of crop.* New York: Columbia University Press. p.269-284.
- Silva, R. M.; Bandel, G.; Faraldo, M. I. F.; Martins, P. S. 2001. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. *Scientia Agrícola*, 58(1): 101-107.
- Silva, S. O.; Monoel, T. S.; Silva, R. P. 1992. Diferenciação de clones de *Manihot esculenta* Crantz mediante o emprego de características botânico - agronômicas e zimograma de alfa e beta esterase. *Revista Brasileira de Mandioca*, 11(1): 79-88.
- Studnicki, M.; Mađry, W.; Kociuba, W. 2011. The efficiency and effectiveness of sampling strategies used to develop a core collection for the Polish spring triticale (\times *Triticosecale* Wittm.) germplasm resources. *Communications in Biometry and Crop Science*, 5(2): 127–137.
- Sun, Q.; Bai, L.; Ke, L.; Xiang, X.; Zhao, J.; Ou, L. 2011. Developing a core collection of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) based on EST-SSR genotype data and agronomic traits. *Scientia Horticulturae*, 146: 29–38.
- Upadhyaya, H. D.; Dwivedi, S. L.; Ambrose, M.; Ellis, N.; Berger, J.; Smykal, P.; Debouck, D.; Duc, G.; Dumet, D.; Flavell, A.; Sharma, S. K.; Mallikarjuna, N.; Gowda, C. L. L. 2011. Legume genetic resources: management, diversity assessment, and utilization in crop improvement. *Euphytica*, 180: 27–47.
- van Hintum, T. J. L.; Brown, A. H. D.; Spillane, C.; Hodgkin, T. 2000. Core collections of plant genetic resources. *Technical Bulletin N°3*. Rome, Italy: IPGRI.
- Wang, J. C.; Hu, J.; Xu, H. M.; Zhang, S. 2007. A strategy on constructing core collections by least distance stepwise sampling. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(1): 1–8.

APÊNDICE - Informações sobre os acessos conservados no BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental, última coleta de folhas realizada em janeiro de 2013.

REGIÃO	LOCALIDADES/ Acessos	BRAVA	MANSA
BAIXO AMAZONAS	Barreirinha/15	0	0
	Boa Vista do Ramos/8	0	0
	Faro/10	0	0
	Itacoatiara/3	0	0
	Presidente Figueiredo/1	0	0
	Itapiranga/13	0	0
	Juruti/19	0	0
	Nhamundá/12	0	0
	Parintins/9	3	2
	S. Sebastião do Uatumã/7	0	0
Total	Urucará/15 114	1 4	3 5
RIO MADEIRA	Rondônia/4	1	0
	Humaitá/33	19	8
	Autazes/2	0	0
	Borba/16	0	4
	Manicoré/33	0	5
	Nova Olinda/14	0	4
	Novo Aripuanã/20	0	5
Total	122	20	26
RIO NEGRO	Barcelos/3	3	0
	Manaus/6	1	1
	S.I.do R. Negro/11	6	1
	Novo Airão/1	0	0
Total	20	10	2
RIO PURUS	Acre/2	1	1
	Guajará/1	0	0
	Boca do Acre/5	3	2
	Pauini/4	0	2
	Lábrea/2	2	0
	Canutama/4	2	0
Total	18	8	5
RIO SOLIMÕES	Atalaia do Norte/2	0	2
	Alvarães/1	0	0
	Anamá/9	8	1
	Anori/35	27	7
	B. Constant/6	1	4
	Irاندuba/4	0	1
	Manacapuru/1	0	0
	Manaquiri/1	0	0
	S. P. de Olivença/17	10	5
	Tabatinga/17	10	7
	Tefé/6	2	1
Uarini/14	4	3	
Total	113	62	31
SEM IDENTIFICAÇÃO (Outros Estados e que não possuem identificação de localidades)	Bahia/19 Amapá/1 Belém/1 Sem Iden/62	5 0 0 2	3 0 0 3
Total	83	7	6
TOTAL GERAL	470	111	75

