



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL**

Kryssia Gislayne Pinheiro Melo

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE  
ACESSOS DE *Manihot* Muell. CULTIVADOS NO  
SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Petrolina - PE

2016

**KRYSSIA GISLAYNE PINHEIRO MELO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE  
ACESSOS DE *Manihot* Muell. CULTIVADOS NO  
SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo

Co-orientador: Dra. Rafaela Priscila Antonio

Petrolina - PE

2016

Melo, Kryssia Gislayne Pinheiro

M528c Caracterização Molecular e Citogenética de Acessos de *Manihot* Muell. Cultivados no Semiárido Brasileiro / Kryssia Gislayne Pinheiro Melo.--Petrolina, 2016.

xii, 46 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação de Mestrado (Pós Graduação em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2016.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Nataniel Franklin de Melo.

#### Referências

1. Mandioca. 2. Maniçoba. 3. Pornunça. I. Título. II. Melo, Nataniel Franklin de. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 633.682

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca

SIBI/UNIVASF

Bibliotecário: Márcio Pataro

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

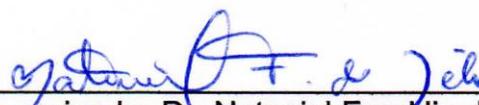
Kryssia Gislayne Pinheiro Melo

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE**  
*Manihot* Muell. CULTIVADOS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 28 de Julho de 2016.

**Banca Examinadora**

  
\_\_\_\_\_  
Pesquisador Dr. Nataniel Franklin de Melo  
Embrapa Semiárido

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Joselita Cardoso de Souza  
Universidade do Estado da Bahia - UNEB

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti  
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

## DEDICATÓRIA

A Deus, que me criou e mantém o meu fôlego de vida, por ser a minha essência, por me dar força e coragem nas dificuldades e por me abençoar sempre, fornecendo o meu sustento e cuidando de mim a cada dia. E que cada conquista obtida seja para honra e glória do Senhor.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me conceder inteligência, sabedoria e saúde necessárias para exercer este trabalho, me dar ânimo quando não mais o tinha e não me deixar desistir.

Aos meus pais Antonio Pinheiro Soares e Maura Regina de Melo Pinheiro, por acreditarem na minha capacidade e confiarem em mim e me apoiarem sempre em qualquer circunstancia.

Às minhas irmãs Karla Juliana Pinheiro Melo, Kássia Jéssika Pinheiro Melo e Clara Júlia de Melo Pinheiro por me apoiarem e por sonharem comigo por um futuro melhor.

Aos meus avós, paternos e maternos, dos quais apenas os maternos se encontram em vida, Expedito Vieira da Silva e Ana Ferreira Melo, que mesmo distantes se fazem presentes através de palavras de encorajamento, admiração e amor.

A todos os meus familiares que me ajudaram para que a realização de mais esta conquista, em especial a meu tio-avô Antonio de Alcântara Barros, que não se encontra mais conosco, mas esteve sempre presente e que acreditou na realização de grandes conquistas.

A João Marcos Chagas dos Anjos, que sempre foi um grande companheiro durante o mestrado, me auxiliando sempre que necessário.

A todos da Escola Família Agrícola Dom Fragoso que me incentivaram a buscar um crescimento profissional, fornecendo a preparação inicial para isto. Destaco as minhas monitoras e amigas Maria Rosinira Bezerra Cavalcante e Francisca Maria Lopes do Nascimento.

A Universidade do Estado da Bahia que me forneceu muitos conhecimentos através de professores, colegas e amigos, em especial a Prof.<sup>a</sup> Dra. Joselita Cardoso de Souza.

Aos meus colegas de mestrado Moisés Félix de Carvalho Neto, Júnia Naara da Silva Carvalho e Lígia Tuani da Silva Santos, parceiros nas atividades acadêmicas e companheiros nas aflições e nos momentos de descontração.

A Elenício Gomes Coelho, Francisco Manoel de Souza e Angela Katiussia Nascimento dos Santos Coelho, funcionários da Embrapa Semiárido, por todo o auxílio e tempo disponibilizado para a realização da implantação do meu trabalho e execução das análises.

Aos companheiros do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, àqueles que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, Maria Maiany de Oliveira, Simone Sales Souza e a todos os bolsistas e estagiários.

Ao Dr. Nataniel Franklin de Melo, em especial, por ser meu orientador e por desempenhar um ótimo papel como profissional e pela sua agradável companhia. Pela confiança, pelo tempo disponibilizado para a orientação, por ser compreensivo e pelo conhecimento compartilhado.

A Facepe - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pelo apoio financeiro disponibilizado.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por disponibilizar o espaço e os materiais necessários à pesquisa.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco, pela qualidade do programa de pós-graduação fornecido.

A todos que me ajudaram e contribuíram de alguma maneira na minha vida.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de acessos de *Manihot* com a utilização de marcadores moleculares entre repetições de sequência simples (ISSR - inter simple sequence repeat), caracterizar o padrão de heterocromatina e analisar a viabilidade de grãos de pólen. Foram utilizados 15 acessos para análise molecular, sendo cinco de mandiocas, cinco de maniçobas e cinco de pornunças, com 10 primers ISSR, os quais produziram um total de 60 bandas entre 120 e 1300 pb, das quais 7 foram monomórficas e 53 polimórficas. Obteve-se um valor médio total de 88,3% de polimorfismo entre os genótipos avaliados. Os valores de dissimilaridade genética (dg), calculados de acordo com o complemento do índice de Jaccard, variaram de 0,21 a 1,0, com valor médio de 0,61. Por meio da análise de agrupamento pelo método das médias não ponderadas de grupos pareados (UPGMA - Unweighted Pair Group Method Average) foi possível observar a formação de seis grupos distintos. Os acessos MB1 e P2 foram os mais dissimilares e MB1 e MP2 os menos dissimilares. Os marcadores ISSR utilizados neste estudo demonstraram eficiência na detecção de polimorfismos moleculares, revelando variabilidade genética entre os 15 acessos. É possível inferir que existe considerável variabilidade genética entre os acessos de *Manihot*, demonstrando a importância desses marcadores na caracterização e análise de variabilidade desse germoplasma. Para as análises citogenéticas foram usados nove acessos de *Manihot* entre mandiocas, maniçobas e pornunças, por meio da coloração CMA/DAPI, e oito acessos para a viabilidade polínica utilizando a coloração com carmim acético, em quatro maniçobas e quatro pornunças. Foi observado  $2n=36$  cromossomos para todos os acessos. A coloração com fluorocromos CMA/DAPI revelou regiões heterocromáticas CMA<sup>+</sup>, cujo número de blocos variou de seis a oito nos acessos de mandioca e de maniçoba, e de seis a doze nas pornunças. Todos os acessos apresentaram viabilidade polínica acima de 80%. O diâmetro médio dos grãos de pólen viáveis apresentou valores acima de 100 µm. Os acessos de maniçoba e de pornunça apresentam viabilidade polínica alta, podendo ser recomendados como genótipos doadores de pólen em trabalhos de pesquisa com melhoramento genético. Todavia, enquanto o diâmetro dos grãos de pólen da maniçoba não apresentou variação significativa, os de pornunça são bastante variáveis, sendo um indicativo de possíveis anormalidades meióticas devidas a hibridações anteriores.

**Palavras-chave:** ISSR. Mandioca. Maniçoba. Pornunça. Viabilidade polínica.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of *Manihot* accessions to the use of molecular markers ISSR (inter simple sequence repeat), characterize the pattern of heterochromatin and analyze the viability of pollen grains. 15 accessions were used for molecular analysis, five of yuccas, five maniçobas and five pornunças with 10 ISSR primers, which produced a total of 60 bands between 120 and 1300 bp, of which 7 were monomorphic and 53 polymorphic. There was obtained a total average of 88.3% of polymorphism between genotypes. The values of genetic dissimilarity (dg), calculated according to the complement of the Jaccard index, ranged from 0.21 to 1.0, with an average value of 0.61. Through cluster analysis by UPGMA method (unweighted Pair Group Method Average) it was possible to observe the formation of six different groups. The MB1 and P2 hits were the most dissimilar and MB1 and MP2 less dissimilar. The ISSR markers used in this study were efficient in detecting molecular polymorphisms, revealing genetic variability among 15 accessions. It is possible to infer that there is considerable genetic variability among *Manihot* accessions, demonstrating the importance of these markers in the characterization and analysis of variability of this germplasm. For cytogenetic analyzes were used nine *Manihot* accessions among cassava, maniçobas and pornunças were analyzed by CMA/DAPI staining, and eight accessions to the pollen viability staining using acetic carmine, in four maniçobas and four pornunças. It was observed  $2n = 36$  chromosomes for all accessions. Staining with fluorochromes CMA / DAPI revealed heterochromatic regions CMA+, where the number of blocks ranged from six to eight in cassava and maniçoba accessions, and from six to twelve in pornunças. All accessions showed pollen viability above 80%. The mean diameter of viable pollen grains showed values above 100 micrometers. The maniçoba and pornunça accessions have high pollen viability, and can be recommended as pollen donor genotypes in research work on genetic breeding programs. However, as the diameter of pollen grains of maniçoba did not change significantly, the pornunça are quite variable, being indicative of possible meiotic abnormalities due to previous hybridizations.

**Key-words:** ISSR. Cassava. Maniçoba. Pornunça. Pollen viability.

## Lista de figuras

Capítulo 1	Pág.
Figura 1 – <i>Manihot esculenta</i> Crantz - Mandioca (A), <i>Manihot</i> spp. - Pornunça (B), <i>Manihot pseudoglaziovii</i> Muell. Arg. - Maniçoba (C).	16
<b>Capítulo 2</b>	
Figura 1 – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de 15 acessos de <i>Manihot</i> do Banco Ativo de Germoplasma e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero <i>Manihot</i> da Embrapa Semiárido. Correlação cofenética ( $r \geq 0,97$ ).	34
Figura 2 – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de cinco acessos de mandioca do Banco Ativo de Germoplasma e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero <i>Manihot</i> da Embrapa Semiárido. Correlação cofenética ( $r \geq 0,90$ ).	37
Figura 3 – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de cinco acessos de pornunças do Banco Ativo de Germoplasma e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero <i>Manihot</i> da Embrapa Semiárido. Correlação cofenética ( $r \geq 0,95$ ).	38
Figura 4 – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de cinco acessos de maniçobas do Banco Ativo de Germoplasma e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero <i>Manihot</i> da Embrapa Semiárido. Correlação cofenética ( $r \geq 1,0$ ).	39
<b>Capítulo 3</b>	
Figura 1 – Coloração DAPI (A, D e F), CMA (B, E e G) e dupla coloração CMA/DAPI (C, F e H) em metáfases mitóticas com $2n=36$ em acessos de <i>Manihot</i> . A-C mandioca (acesso MB1), D-E maniçoba (acesso M1), F-H pornunça (acesso P4). Setas indicam regiões de cromatina mais brilhantes com coloração CMA.	49
Figura 2 – Grãos de pólen corados com carmim acético de quatro acessos de maniçoba cultivadas no Vale do São Francisco. Coloração mais intensa e maior diâmetro indicam grãos de pólen viáveis, enquanto que coloração clara e menor diâmetro estão relacionados a grãos de pólen inviáveis. Valores das medições estão em micrômetros.	52
Figura 3 – Grãos de pólen corados com carmim acético de quatro acessos de pornunça cultivadas no Vale do São Francisco. Coloração mais intensa e maior diâmetro indicam grãos de pólen viáveis, enquanto que coloração clara e menor diâmetro estão relacionados a grãos de pólen inviáveis. Valores das medições estão em micrômetros.	53

## Lista de tabelas

Capítulo 2	Pág.
Tabela 1 – Identificação, nome comum, origem, e utilização de 15 acessos de <i>Manihot</i> para a avaliação da diversidade genética utilizando marcadores ISSR.	28
Tabela 2 – Lista de primers ISSR e sua sequência (5'-3 ') utilizados para análise da diversidade genética em acessos de <i>Manihot</i> do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.	30
Tabela 3 – Lista de primers ISSR, número total de bandas (NTB), número de bandas monomórficas (NBM), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P%) e amplitude de fragmentos (AF) em 15 genótipos de <i>Manihot</i> .	32
Tabela 4 – Iniciadores ISSR utilizados na amplificação dos genótipos de <i>Manihot</i> , com suas respectivas sequências, número total de bandas (NTB), número de bandas monomórficas (NBM), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P%), número de bandas por genótipo (NBG) e amplitude de fragmentos (AF).	35
<b>Capítulo 3</b>	
Tabela 1 – Identificação, nome comum e científico, origem, utilização, e código de nove acessos de <i>Manihot</i> utilizados para estudo citogenético e de viabilidade polínica.	46
Tabela 2 – Percentual de viabilidade polínica e diâmetro médio de grãos de pólen de diferentes acessos de maniçoba ( <i>Manihot pseudoglaziovii</i> Muell. Arg.) cultivados no Vale do São Francisco.	50
Tabela 3 – Percentual de viabilidade polínica e diâmetro médio de grãos de pólen de acessos de pornunça ( <i>Manihot</i> spp.) cultivados no Vale do São Francisco.	50

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Gênero <i>Manihot</i> .....	15
2.2. Mandioca, maniçoba e pornunça.....	16
2.3. Caracterização Molecular.....	19
2.4. Caracterização citogenética.....	20
3. REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2.....	27
4. Aplicação de marcadores ISSR na caracterização de acessos do gênero <i>Manihot</i> .....	27
Resumo.....	27
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e métodos.....	28
Resultados e Discussão.....	33
Conclusões.....	41
Referências.....	41
CAPÍTULO 3.....	44
5. Coloração diferencial CMA/DAPI de cromossomos mitóticos e viabilidade polínica em acessos de <i>Manihot</i> .....	44
Resumo.....	44
Abstract.....	44
Introdução.....	45
Material e métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	48
Conclusões.....	54
Referências.....	55
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

O Semiárido Brasileiro é caracterizado principalmente por um curto período de chuvas irregulares, seguido de um longo período de estiagem. Com estas limitações e a predominância da vegetação Caatinga, que apresenta restrições para produção de forragem durante todo o ano, surge a necessidade de uma suplementação alimentar para os animais no período de seca, principalmente de plantas com potencial forrageiro que possuem maior adaptação ao clima, como a pornunça (*Manihot* spp.).

Nativa da Caatinga, a pornunça é um provável híbrido natural entre a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e a maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii* Muell. Arg.), possuindo características semelhantes de ambas as espécies, sendo grande produtora de área foliar, tolerante a estresse hídrico, resistente a pragas, com boa capacidade de rebrota quando cortada, e de fácil propagação. Contém alto teor de proteína bruta e produtividade elevada, podendo ser processada e armazenada como feno e silagem. Tem uma boa aceitação pelos animais, e serve também como flora apícola para as abelhas. Suas folhas e frutos são semelhantes aos da mandioca, e seu caule ao da maniçoba, herdando também a rusticidade e qualidade forrageira destas duas espécies vegetais.

A caracterização molecular e citogenética é uma forma de conseguir informações importantes para os melhoristas, uma vez que permitem acessar e compreender a variabilidade genética existente, possibilitando uma seleção mais eficiente dos recursos genéticos. A análise cariotípica nas células mitóticas e/ou meióticas possibilita a identificação do número de cromossomos, dos polimorfismos estruturais entre os cariótipos e a descrição das homologias cariotípicas, entre outras informações relevantes, como alterações cromossômicas, taxa de fertilidade, problemas no reconhecimento dos homólogos, e identificação de anormalidades que inviabilizam a formação ou

função do grão de pólen. Dessa forma, a indicação de parentais favoráveis a hibridações pode ser auxiliada pelo uso de características citogenéticas.

Os marcadores moleculares, por outro lado, permitem a avaliação de um número elevado de genótipos em um curto espaço de tempo, além de não serem influenciados pelo ambiente, como acontece com marcadores morfológicos. Portanto, têm sido utilizados frequentemente nos estudos de várias espécies, dentre elas aquelas pertencentes ao gênero *Manihot*. Os marcadores ISSR, são amplamente utilizados nos estudos de caracterização molecular, gerando altos índices de polimorfismos, permitindo a identificação correta de indivíduos e a seleção de acessos que possam gerar combinação de alelos favoráveis.

Dessa forma, o presente trabalho visou caracterizar citogenética e molecularmente acessos de *Manihot* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot*, como instrumento para a valoração do germoplasma, e geração de informações que possibilitem o seu uso em programas de melhoramento genético. Especificamente, caracterizar a diversidade genética via marcador molecular ISSR, investigar a variabilidade cromossômica por meio da coloração CMA/DAPI, e analisar a viabilidade polínica.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Gênero *Manihot*

O gênero *Manihot* foi descrito por Miller (1754) e teve sua taxonomia revisada por Rogers e Appan (1973). Apresenta um grande número de espécies, e 100 são de origem americana. No Brasil há registros de cerca de 78 espécies, sendo 67 consideradas nativas. Essas espécies estão distribuídas por todo o país, todavia, são considerados os centros de diversidade no Brasil os estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais e o Planalto Central (ORLANDINI e LIMA, 2014). Segundo Duputié, Salick e Mckey (2011) existem dois centros de endemismo do gênero: no sudoeste do México (com 18 espécies reconhecidas na Mesoamérica), e no cerrado do Brasil central (com 41 espécies descritas no estado brasileiro de Goiás e Distrito Federal).

As espécies deste gênero podem ocorrer em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo e variam quanto ao padrão de crescimento (UMANAH e HARTMANN, 1973). De acordo com Nassar (2000) o gênero é constituído por plantas arbóreas, subarbustivas, arbustivas e raramente trepadeiras. As folhas são alternadas, geralmente lobadas, flores variando de gamo a dialissépalas, além de frutos capsulares e sementes carunculadas. Ainda segundo este autor, a maioria das espécies produz látex e contém glicosídeos cianogênicos capazes de liberar ácido cianídrico por meio de reações de hidrólise.

As raízes de espécies selvagens são mais delgadas e fibrosas, algumas apresentando frequentemente um número limitado de raízes tuberosas. A superfície radicular é lisa ou áspera, e as subepidérmicas variam de vermelho ou amarelo para branco. O córtex de raízes de espécies tuberosas pode ser branco, creme ou amarelo (CARMO JÚNIOR, et al. 2013). As plantas são monóicas, possuindo flores femininas e masculinas na mesma inflorescência. As femininas são unissexuadas por aborto de estames e a polinização é realizada principalmente por abelhas e vespas. A maturação das flores femininas antecede a das flores masculinas, admitindo que as plantas do gênero *Manihot* são pertencentes ao grupo das plantas alógamas (CABRAL, 2001).

Apesar da grande variabilidade genética existente nos bancos de germoplasma, esses são ainda pouco estudados sob o ponto de vista genético, sendo importante conhecer a distribuição dessa variabilidade. É essencial o conhecimento da natureza genética, uma vez que esta é correlacionada com características agrônômicas importantes, como a produtividade e qualidade do produto. A escassez de informações faz com que a conservação e caracterização do germoplasma se torne necessária e assegure informações sobre fontes de genes para futura utilização, buscando o sucesso da produção agrícola (COSTA; CARDOSO; OHAZE, 2003).

Em geral, o gênero *Manihot* apresenta uma ampla diversidade genética interespecífica e intraespecífica. A fraca barreira de isolamento reprodutivo entre suas espécies possibilita a ocorrência de hibridação interespecífica entre as espécies cultivadas, como a mandioca, e as espécies silvestres (NASSAR et al., 1995; SIQUEIRA et al., 2009). Citogeneticamente, as espécies mostram-se bastante estáveis em nível cariotípico.

Todas as espécies do gênero analisadas até o momento apresentam  $2n=36$  cromossomos, sendo estes de tamanho pequeno e muito semelhantes morfológicamente. Um estudo de 39 cultivares de *M. esculenta* Crantz e oito espécies nativas, por exemplo, confirmou  $2n=36$  para todos os genótipos, exceto para a cultivar Manipeba de *M. esculenta*, que apresentou  $2n=54$ , considerando-se como um triploide espontâneo (CARVALHO; GUERRA; CARVALHO, 1999; CARVALHO e GUERRA, 2002).

## **2.2. Mandioca, maniçoba e pornunça**

As plantas do gênero *Manihot* apresentam grande importância no semiárido brasileiro. Nesta região, geralmente dependente de chuvas, tanto a mandioca quanto a maniçoba estão presentes nos cultivos e consumo dos pequenos produtores, utilizando-as para diversos fins e por serem resistentes à seca. Além destas, a pornunça é outro representante do gênero que apresenta grande potencial para utilização na alimentação animal (FERREIRA et al., 2009).



**Figura 1.** *Manihot esculenta* Crantz - Mandioca (A), *Manihot* spp. - Pornunça (B), *Manihot pseudoglaziovii* Muell. Arg. - Maniçoba (C).

A mandioca tem a maior parte de sua produção destinada principalmente a alimentação humana, sendo as raízes a parte principal consumida e utilizada na fabricação de diversos produtos e subprodutos. Em muitos países é o alimento que predomina na dieta diária, como fonte de carboidrato, sendo consumida por mais de 600 milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Sua maior utilização encontra-se em países em desenvolvimento, principalmente para diminuir a grande deficiência calórica e subnutrição generalizada. Além da alimentação humana, é também utilizada para alimentação animal (Figura 1A) (EL-SHARKAWY, 2006; LIMA et al., 2002).

A mandioca pode ser classificada de duas maneiras: como de mesa ou mansa, também conhecida em algumas regiões do Brasil como macaxeira ou aipim, e a mandioca brava, que possui taxas de ácido cianídrico elevado. A mansa pode ser consumida logo após o cozimento, apresentando um baixo teor de ácido cianídrico (de até 100 mg eq. HCN kg<sup>-1</sup>) (MEZETTE et al., 2009). E aquelas com taxas de ácido cianídrico elevado são utilizadas principalmente na fabricação de farinhas e féculas (VALLE et al., 2004).

Apesar de a mandioca ser uma planta muito conhecida e utilizada, outras espécies do gênero *Manihot* têm uso pouco difundido e estudado. As espécies silvestres relacionadas com a mandioca, como a maniçoba ou a pornunça, apresentam características de tolerância à seca e a solos marginais, podendo, inclusive, ser utilizadas na alimentação animal, quando bem conduzidas e manejadas. Este manejo envolve um maior número de podas

durante o ano, além de cuidados com a fertilização do solo visando à manutenção de um sistema de produção sustentável (ARAÚJO FILHO et al., 2011; ALENCAR et al., 2015).

A maniçoba é mais utilizada como forragem para os animais, na forma de feno ou silagem. Apresenta grande resistência à seca, em função de ter um sistema de raízes tuberculadas bastante desenvolvido, onde acumula suas reservas, possuindo boa adaptação ao clima semiárido e apresentando alta produtividade, além de rebrotar rapidamente quando cortada na chegada das chuvas e ter um valor nutritivo significativo (DANTAS et al., 2008).

A maniçoba, como as demais plantas do gênero *Manihot*, apresenta em sua composição, quantidades variáveis de carboidratos denominados glicosídeos cianogênicos que ao hidrolisarem-se mediante a ação de uma enzima, dão origem ao ácido cianídrico. Este ácido, dependendo da quantidade ingerida por um animal, pode provocar intoxicação (AMORIM; MEDEIROS, RIET-CORREA, 2006; ARAÚJO, 2001).

A pornunça é uma planta nativa encontrada em diversos estados do Nordeste brasileiro possuidores de mata nativa (Caatinga). É conhecida como pornuncia, prinunça, pornona, mandioca de sete anos, mandioca de jardim, maniçoba de jardim (SILVA et al., 2009). Estes autores também afirmam que a pornunça, além de ter o potencial produtivo melhor que outras plantas do mesmo gênero, tem apresentado menores conteúdos de ácido cianídrico do que outras espécies, proporcionando certa segurança para o produtor diante dos possíveis riscos de intoxicação.

Segundo Ferreira et al. (2009) poucos criadores conhecem a planta e, menos ainda, sabem como manejá-la adequadamente para a utilização de todo o seu potencial forrageiro. Ainda de acordo com esses autores, a pornunça seria um híbrido natural entre a mandioca e a maniçoba. Tem características intermediárias das duas espécies, sendo tolerante a estresse hídrico intenso e, ultimamente, vem sendo usada como forrageira para alimentação animal, por ter grande potencial para produção foliar.

A qualidade dessas forrageiras do gênero *Manihot* evidencia-se pelo elevado teor de proteína e maior teor de carboidratos não fibrosos

(carboidratos de degradação rápida) em relação às gramíneas tropicais (AZEVEDO et al., 2006; DANTAS et al., 2008). Ferreira et al. (2009) encontraram os seguintes teores de proteína bruta (PB) para a mandioca (26,19%), maniçoba (19,14%) e pornunça (27,58%). Santana, Nascimento e Lima (2008) encontraram valor mais alto para a maniçoba (22,26%) e no trabalho de Ferreira et al. (2007) valor semelhante foi obtido para a mandioca (25,07%).

### **2.3. Caracterização Molecular**

O conhecimento da variabilidade genética das espécies vegetais e também como estas estão distribuídas, proporciona o uso sustentável e racional dos recursos genéticos. Técnicas com a utilização de marcadores moleculares encontram-se disponíveis e constitui uma das ferramentas mais importantes e interessantes para a caracterização dos bancos ativos de germoplasma de diversas espécies (DANTAS, et al., 2012).

A caracterização de genótipos praticada com base nas características morfológicas e agrônômicas apresenta algumas limitações, como a restrição da realização das análises em qualquer período do ano, além de requerer um custo elevado e um tempo prolongado de análises, podendo estas sofrerem influências ambientais. Alternativamente, os marcadores moleculares estão sendo utilizados como uma ferramenta de complementação na caracterização de germoplasma, auxiliando para identificações de diferentes genótipos (BIANCHI, et al., 2002; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; NUNES, et al., 2008).

Os marcadores moleculares são bastante eficazes nos estudos genômicos, sendo uma ferramenta rápida, detectando o polimorfismo diretamente ao nível de DNA sem sofrer qualquer tipo de influencia ambiental. Estudos com marcadores moleculares permitem aumentar a eficiência dos programas de melhoramento genético e, com base no polimorfismo, é possível fazer inferências das relações entre genótipo e fenótipos dos indivíduos em estudo (MARTINS, et al., 2011).

A análise molecular a ser escolhida depende principalmente da sua simplicidade e reprodutibilidade. Uma das técnicas que é bastante utilizada desde 1994 é o marcador molecular ISSR (ZIETKIEWICZ, et al., 1994). ISSRs são marcadores amplificados por PCR (Polymerase Chain Reaction), reação em cadeia da polimerase na presença de um oligonucleotídeo (*primer*) complementar para um determinado microssatélite. As sequências alvo dos ISSRs são de grande abundância ao longo de todo o genoma dos eucariotos, evoluindo rapidamente (DÁVILA; CASTILLO; LAURENTIN, 2007; ESSELMAN et al., 1999; FANG e ROOSE, 1997).

O ISSR, marcador dominante, é uma técnica simples, de baixo custo, de fácil uso, bastante eficiente e de alta reprodutibilidade mostrando-se uma poderosa ferramenta para análise da diversidade genética, bem como para a caracterização de acessos e cultivares de diversas espécies (SILVA, et al., 2011).

#### **2.4. Caracterização citogenética**

Ao longo do tempo as técnicas de coloração cromossômica baseadas em carmim, Giemsa e bandas foram adaptadas e otimizadas para a caracterização citogenética de espécies de diferentes plantas. Dentre os métodos citogenéticos utilizados, a análise cariotípica em células mitóticas e/ou meióticas identifica uma série de informações relevantes, como alterações cromossômicas estruturais, número de cromossomos do cariótipo das espécies, entre outras. Desta forma, a indicação de parentais favoráveis a hibridações pode ser auxiliada de forma relevante por esses parâmetros citogenéticos (CARVALHO et al., 2009; FIGUEROA e BASS, 2010).

Dentre as técnicas de citogenética utilizadas para o estudo da variabilidade genética está o bandeamento com coloração CMA/DAPI, informando a constituição da heterocromatina. Esta técnica detalha o padrão de distribuição das bases nitrogenadas pelo uso do fluorocromo cromomicina A3 (CMA) que cora preferencialmente regiões ricas em GC e 4'6-diamidino-2-phenilindol (DAPI), que cora preferencialmente regiões ricas em AT (DAPI) (Guerra, 2000).

Muitas espécies cultivadas vêm sendo caracterizadas por um número variado de técnicas de citogenética, visando a detecção de alterações estruturais e do número de cromossomos, subsidiando a reconstrução da evolução histórica e de mapas genéticos. Mesmo em gênero com cromossomos pequenos e número estável de cromossomos, é possível identificar citogeneticamente as diferenças entre as espécies (CARVALHO e GUERRA, 2002).

De acordo com Nassar (1986) espécies silvestres de *Manihot* representam uma grande fonte potencial de muitos caracteres genéticos, entretanto, agronomicamente, algumas características encontradas possuem uma pobreza notável no que diz respeito ao teor de proteína na raiz, geralmente são encontrados níveis muito baixos, menores que 2%. Vale salientar que as espécies de *Manihot* hibridizam facilmente, o que contribui para a grande variação dentro deste grupo e para a evolução do grande número de espécies existente.

Nestes materiais que apresentam indícios de hibridação, existem outros parâmetros citogenéticos que podem ser analisados, entre eles a viabilidade polínica. Segundo Nolasco (2011), o estudo da análise da viabilidade do grão de pólen permite indicar o potencial da planta para cruzamentos, fornecendo subsídios para usos futuros em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes viáveis. Ainda de acordo com o autor a determinação da viabilidade do pólen, associada a meiose, é fundamental na investigação das causas da infertilidade das plantas, assim como para o conhecimento do potencial de reprodução de uma população e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer.

A análise da viabilidade polínica é importante para o estudo do fluxo gênico em plantas, evidenciando o potencial masculino e reprodutivo da espécie, podendo ser útil também em estudos taxonômicos, genéticos, palinológicos e ecológicos. Vale salientar que existe um grande número de causas que pode levar a inviabilidade do pólen, sendo estas muitas vezes não genéticas, como fatores físicos, de temperatura e umidade, incluindo também a idade do pólen (HISTER e TEDESCO, 2016).

### 3. REFERÊNCIAS

ALENCAR, F. H. H.; SILVA, D. S.; ANDRADE, A. P.; CARNEIRO, M. S. S.; FEITOSA, J. V. Composição química e digestibilidade da pornunça sob duas fontes de adubação orgânica e cortes. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 3, p. 215 – 222, 2015.

AMORIM, S. L.; MEDEIROS, R. M. T.; RIETCORREA, F. Intoxicações por plantas cianogênicas no brasil. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2006.

ARAÚJO FILHO, J. T.; PAES, R. A.; AMORIM, P. L.; BARROS, T.S.; SILVA, R. A.; SILVA, S. C. Características morfológicas e valor nutritivo da maniçoba submetida a espaçamentos de plantio e adubações. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 3, p. 573-582, 2011.

ARAÚJO, G. G. L.; MOREIRA, J. N.; CAVALCANTI, J.; TURCO, S. H. N. Feno de maniçoba uma alternativa de volumoso para ovinos no Semi-árido brasileiro: consumo, digestibilidade e desempenho animal. **Embrapa Semi-árido: Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, Petrolina, n.59, 2001.

AZEVEDO, E.B.; NÖRNBERG, J.L.; KESSLER, J.D.; BRUNING, G.; DAVID, D.B.; FALKENBERG, J.R.; CHIELLE, Z.G. Silagem da parte aérea de cultivares de mandioca. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1902-1908, 2006.

BIANCHI, V.J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J.C.; TARTARINI, S.; SANSVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, rivolutivi nella identificazione genética delle varietà di susino. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, v. 64, n. 4, p.83-87, 2002.

CABRAL, B. L. R. **Variabilidade isoenzimática de 200 acessos de mandioca (*Manihot esculente* Crantz)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 78 p, 2001.

CARMO JÚNIOR, J. E.; SODRÉ, R. C.; SILVA, M. J.; SALES, M. F. *Manihot* no Parque Estadual da Serra Dourada. **Rodriguésia**, Goiânia, v. 64, n. 4, p.727-746, 2013.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 159-168, 2002.

CARVALHO, R.; GUERRA, M.; CARVALHO, P.C.L. Occurrence of Spontaneous Triploidy in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia: The Japan Mendel**, v. 64, p. 137-140, 1999.

CARVALHO, R.; SILVA, K. V. P.; OLIVEIRA, I. F.; ALVES, A. A. C. Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: Análise mitótica e meiótica em espécies de *manihot*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 8., 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Unesp, 2009. p.645-650.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p.158-164, 2003.

DANTAS, A. C. A.; NUNES, G. H. S.; ARAÚJO, I. S.; ALBUQUERQUE, L. B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 183-189, 2012.

DANTAS, F. R.; ARAÚJO, G. G. L.; SILVA, D. S.; PEREIRA, L. G. R.; GONZAGA NETO, S.; TOSTO, M. L. Composição química e características fermentativas de silagens de maniçoba (*Manihot* sp.) com percentuais de co-produto de vitivinícolas desidratado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Brasília, v.9, n.2, p. 247-257, 2008.

DÁVILA, M.; CASTILLO, M. A.; LAURENTIN, H. Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en Agave. **Revista de la Facultad de Agronomía LUZ**, Maracay, v. 33, p. 93-111. 2007.

DUPUTIÉ A.; SALICK, J.; MCKEY D. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 1033–1043, 2011.

EI-SHARKAWY, M.A. International research on cassava photosynthesis, productivity, eco-physiology, and responses to environmental stresses in the tropics. **Photosynthetica**, República Checa, v.44, n. 4, p.481-512, 2006.

ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L; CRAWFORD, D.J.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Insuperata* (Poaceae) : comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v. 8, p. 443-451, 1999.

FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 408-417, 1997.

FERREIRA, A. L.; SILVA, A. F.; PEREIRA, L. G. R.; BRAGA, L. G. T.; MORAES, S. A.; ARAÚJO, G. G. L. Produção e valor nutritivo da parte aérea da mandioca, maniçoba e pornunça. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 129-136, 2009.

FERREIRA, G. D. G.; OLIVEIRA, R. L.; CARDOSO, E. C.; MAGALHÃES, A. L. R.; BRITO, E. L. Valor nutritivo de co-produtos da mandioca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 364-374, 2007.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa - CENARGEN, 1996. 220p.

FIGUEROA, D. M.; BASS, H. W. A historical and modern perspective on plant cytogenetics. **Briefings in Functional Genomic**, Tallahassee, v. 9, n. 2, p. 95-102, 2010.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

HISTER, C.A.L.; TEDESCO, S.B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 135-141, 2016.

LIMA, G. P. P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I. M. T.; CEREDA, M. P. Efeito do bap e ana e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* crantz cv mcol 22) cultivada in vitro. **Revista brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 2, p. 107-110, 2002.

MARTINS, A. B. G.; RODRIGUES, M. G. F.; PAULA, D. R.; MENDES, H. S. J.; ARANTES, F. C.; SILVA, C. L. S. P. Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1178-1184, 2011.

MEZETTE, T. F.; CARVALHO, C. R. L.; MORGANO, M. A.; SILVA, M. G.; PARRA, E. S. B.; GALERA, J. M. S. V.; VALLE, T. L. Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agrônômicas, tecnológicas e químicas. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 601-609, 2009.

MILLER, P. **The gardeners dictionary**. 4. ed. London: John and James Rivington, 1754. 3 v.

NASSAR, H. N.; NASSAR, N. M. A.; VIEIRA, C.; SARAIVA, L. S. Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and its backcross progeny. **Canadian Journal of Plant SCIENCE**, Quebec, Canadá, v. 75, p. 675–678, 1995.

NASSAR, N. M. A. Genetic variation of wild manihot species native to brazil and its potential for cassava improvement. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 13, p. 177-184, 1986.

NASSAR, N. M. A. Wild Cassava, *Manihot* spp.: Biology and Potentialities for Genetic Improvement. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.23, n.1, p. 201-212, 2000.

NOLASCO, C. A. **Caracterização citogenética e morfológica de híbridos de mandioca (*Manihot esculenta*)**. 2011.46f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

NUNES, A. M.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. F.; CARVALHO, A. Z.; CARDOSO, G. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p.702-707, 2008.

ORLANDINI, P.; LIMA, L. R. Sinopse do gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 51-60, 2014.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. **Manihot and Manihotoides (Euphorbiaceae):** A computer-assisted study. Flora Neotropica, Monograph no.13. Hafner Press, New York, 1973. 272p.

SANTANA, A. F.; NASCIMENTO, T. V. C.; LIMA, M. C. Valor nutritivo da mandioca brava (*Manihot* sp.). **PUBVET**, v. 2, n. 13, p. 1-8, 2008.

SILVA, A. F.; SANTOS, A. P. G.; OLIVEIRA, A. P. D.; MORAES, S. A.; SANTANA, L. M. Produção de forragem e Composição Química da Pornunça cultivada sob Solo com Fertilidade Natural em Petrolina – PE. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, nov. 2009.

SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, set. 2011.

SIQUEIRA, M. V. B. M.; QUEIROZ-SILVA, J. R.; BRESSAN, E. A.; BORGES, A.; PEREIRA, K. J. C.; PINTO, J. G.; VEASEY, E. A. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 104-110, 2009.

UMANAH, E.E.; HARTMANN, R.W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Estados Unidos, v. 98, n. 3, p. 272-274, 1973.

VALLE, T.L.; CARVALHO, C.R.L.; RAMOS, M.T.B.; MÜHLEN, G.S.; VILLELA, O.V. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 221-226, 2004.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, p. 176-183, 1994.

## CAPÍTULO 2

### 4. Aplicação de marcadores ISSR na caracterização de acessos do gênero *Manihot*<sup>1</sup>

#### Resumo

Objetivou-se com este estudo avaliar a diversidade genética de acessos de *Manihot* com a utilização de marcadores moleculares ISSR. Foram analisados 15 acessos, sendo cinco de mandiocas, cinco de maniçobas e cinco de pornunças, com 10 primers ISSR, os quais produziram um total de 60 bandas entre 120 e 1300 pb, das quais 7 foram monomórficas e 53 polimórficas. Obteve-se um valor médio total de 88,3% de polimorfismo entre os genótipos avaliados. Os valores de dissimilaridade genética (dg), calculados de acordo com o complemento do índice de Jaccard, variaram de 0,21 a 1,0, com valor médio de 0,61. Por meio da análise de agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) foi possível observar a formação de seis grupos distintos. Os acessos MB1 e P2 foram os mais dissimilares e MB1 e MP2 os menos dissimilares. Os marcadores ISSR utilizados neste estudo demonstraram eficiência na detecção de polimorfismos moleculares, revelando variabilidade genética entre os 15 acessos. É possível inferir que existe considerável variabilidade genética entre os acessos de *Manihot*, demonstrando a importância desses marcadores na caracterização e análise de variabilidade desse germoplasma.

**Palavras-chave:** Mandioca. Maniçoba. Molecular. Pornunça.

#### Abstract

The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of *Manihot* accesses to the use of molecular markers ISSR. 15 accessions were analyzed, five of yuccas, five maniçobas and five pornunças with 10 ISSR primers, which produced a total of 60 bands between 120 and 1300 bp, of which 7 were monomorphic and 53 polymorphic. There was obtained a total average of 88.3% of polymorphism between genotypes. The values of genetic dissimilarity (dg), calculated according to the complement of the Jaccard index, ranged from 0.21 to 1.0, with an average value of 0.61. Through cluster analysis by UPGMA method (unweighted Pair Group Method Average) it was possible to observe the formation of six different groups. The MB1 and P2 hits were the most dissimilar and MB1 and MP2 less dissimilar. The ISSR markers used in this study were efficient in detecting molecular polymorphisms, revealing genetic variability among 15 accessions. It is possible to infer that there is considerable genetic variability among *Manihot* accesses, demonstrating the importance of

---

<sup>1</sup> A ser submetido para publicação

these markers in the characterization and analysis of variability of this germplasm.

**Key-words:** Cassava. Maniçoba. Molecular. Pornunça.

## Introdução

Existem cerca de 100 espécies selvagens do gênero *Manihot*, fornecendo uma importante herança genética para o melhoramento das espécies deste gênero. A manipulação de genes a partir de espécies selvagens levou a novas cultivares resistentes a pragas e doenças (NASSAR e ORTIZ, 2007). Contudo se faz necessário o estudo da variabilidade genética existente nas populações naturais, de fundamental importância na obtenção de informações para trabalhos de melhoramento, além de possibilitar a identificação de genótipos com maior capacidade produtiva (SAGRILO, et al. 2010).

Várias técnicas possibilitam a identificação do genoma, entre estas os marcadores moleculares acessam o genoma evitando o efeito ambiental e erros de identificação. A técnica de “inter simple sequence repeat” (ISSR), utiliza uma sequência simples repetida como oligonucleotídeo iniciador para amplificar fragmentos de DNA, que gera alto nível de polimorfismo. Por esse motivo vem sendo empregada para a diferenciação rápida entre genótipos, devido ao seu elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (SILVA, et al. 2011; BORBA, et al. 2005).

Os marcadores moleculares são ferramentas importantes na caracterização molecular de acessos de mandioca, por possuírem alta capacidade de detecção das informações contidas no genoma (VIEIRA et al., 2010). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de acessos de *Manihot* com a utilização de marcadores moleculares ISSR.

## Material e métodos

## Material vegetal

Avaliou-se, por meio do uso de marcadores microssatélites ISSR (inter simple sequence repeat), a variabilidade molecular em quinze acessos de *Manihot*, sendo cinco de pornunça (*Manihot* spp.), cinco de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), três de maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii* Muell. Arg.), um de maniçoba *Manihot carthagenensis* subsp. *glaziovii* (Müll. Arg.) Allem, e um de maniçoba *Manihot compositifolia* Allem oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot* da Embrapa Semiárido (Tabela 1).

**Tabela 1** – Identificação, nome comum, origem, e utilização de 15 acessos de *Manihot* para a avaliação da diversidade genética utilizando marcadores ISSR.

Símbolos	Acesso	Nome comum e/ou nome científico	Origem	Utilização	Procedência
MB1	MB1	Mandioca ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	Petrolina - PE	Brava/farinha	CESGM
MP2	BAG 435	Macaxeira do Pará ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	Crateús - CE	Mansa/in natura	BAGES
MC3	BAG 436	Mandioca Cruvela ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	Crateús - CE	Brava/farinha	BAGES
MP4	BAG 437	Macaxeira Preta ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	Crateús - CE	Mansa/in natura	BAGES
MV5	BAG 438	Mandioca Vermelhinha ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	Crateús - CE	Brava/farinha	BAGES
P1	P1	Pornunça ( <i>Manihot</i> spp.)	Petrolina - PE	Fragagem	CESGM
P2	P2	Pornunça ( <i>Manihot</i> spp.)	Petrolina - PE	Fragagem	CESGM
P3	P3	Pornunça ( <i>Manihot</i> spp.)	Petrolina - PE	Fragagem	CESGM
P4	P4	Pornunça ( <i>Manihot</i> spp.)	Petrolina - PE	Fragagem	CESGM
P5	P5	Pornunça ( <i>Manihot</i> spp.)	Petrolina - PE	Fragagem	CESGM
M1	Caatinga - PE	Maniçoba ( <i>M. pseudoglaziovii</i> Muell. Arg.)	Petrolina - PE	Fragagem	CESGM
M2	Caatinga - CE	Maniçoba ( <i>M. pseudoglaziovii</i> Muell. Arg.)	Crateús - CE	Fragagem	CESGM
M3	BGMS11 5	Maniçoba ( <i>M. pseudoglaziovii</i> Muell. Arg.)	Petrolina PE	Fragagem	BAGES
M4	BGMS11	<i>Manihot carthagenensis</i> subsp. <i>glaziovii</i> (Müll. Arg.) Allem	Cruz das Almas - BA	Fragagem	BAGES
M5	BGMS22	<i>Manihot compositifolia</i> Allem	Cruz das Almas - BA	Fragagem	BAGES

\*BAGES = Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido; CESGM = Coleção de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot*.

## Local de condução, coleta e armazenamento do material vegetal

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Estacas de todos os acessos foram plantadas e colocadas no viveiro de mudas. A coleta de folhas foi realizada no período da manhã, sendo acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas em freezer -80 °C até a etapa de extração de DNA.

### Extração de DNA

Para extração do DNA, foi utilizado o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990) com algumas modificações. Para cada acesso, o DNA foi extraído utilizando aproximadamente 2 g de folhas jovens. O material foi macerado com nitrogênio líquido e adicionado a 700 µl de tampão de extração CTAB 2% num microtubo de 2 ml.

As amostras foram colocadas em banho maria a 60 °C por 45 min e homogeneizadas a cada 15 min. Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente por aproximadamente 5 min, foram adicionados 700 µl de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 e homogeneizados levemente por inversão, que posteriormente, foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 min. Em capela de exaustão foi transferido 500 µl do sobrenadante para outro microtubo de 1,5 ml e novamente foi adicionado 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico levando novamente os microtubos à centrifugação a 12.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi retirado 360 µl, sendo adicionado 240 µl de álcool isopropílico gelado para a precipitação dos ácidos nucléicos.

Em seguida, os microtubos foram colocados em gelo por 20 min e posteriormente foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 min. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado, observando se houve a formação de pellet. O DNA foi lavado com 500 µl de etanol 70% e com 500 µl de etanol absoluto. O precipitado foi seco em temperatura ambiente de um dia para o outro e, então, adicionados 15 µl de TE. Após 1 hora, adicionou-se 5 µl

de RNase (10 mg/ml), mantendo à temperatura de 37 °C em banho maria durante 1 hora.

### Quantificação do DNA

A presença e qualidade do DNA genômico foi analisada por meio da comparação visual com bandas obtidas do DNA de fago  $\lambda$  (100 e 25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) corado com brometo de etídio submetidos à voltagem constante de 100 V por 2h. A visualização foi realizada por meio de luz ultravioleta e registrada em aparelho fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia). Posteriormente a concentração das amostras foi ajustada para 10ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### Amplificação de DNA (PCR – reação em cadeia da polimerase)

As amplificações foram conduzidas em termociclador GeneAmp 9600 (Applied Biosystems) em um volume total de 30  $\mu\text{l}$  contendo: 4  $\mu\text{M}$  de primer; 150  $\mu\text{M}$  de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,7 unidade de TaqPolimerase; 40 ng de DNA molde; 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$  e água Milli-Q estéril para o volume final. O mix foi amplificado nas condições de 3 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 45 seg em 50 °C, 1,15 min a 72°C e 5 min a 72°C. Diferentes primers foram testados com o intuito de se selecionar os mais informativos para o estudo da divergência genética (ISSR). Foi feito um *screening* inicial de cinquenta primers, selecionando-se os dez que apresentaram maior número de bandas polimórficas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Lista de primers ISSR e sua sequência (5'-3') utilizados para análise da diversidade genética em acessos de *Manihot* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido.

Primer	Sequência (5'-3')*
ISSR 4 - TriCAC3'YC	CACCACCACCACCACYC

ISSR 5 - TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC
ISSR 6 - TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC
ISSR 11 - TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT
ISSR 12 - TriAAC3'RC	AACAACAACAACAACRC
ISSR 13 - TriACA3'RC	ACAACAACAACAACARC
ISSR 17 - DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA
ISSR 26 - DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT
ISSR 27 - DiGA3'YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
ISSR 30 - DiGA	GAGAGAGAGAGAGAGA

---

\*R = A+G; Y = C+T

### Análise das amplificações

A análise das amplificações foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio utilizando-se o tampão de corrida TBE 0,5x submetidos à voltagem constante de 80 V por 3h e visualizadas sob luz UV e documentadas em fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia). O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Jena Bioscience).

### Análise dos dados

Os marcadores ISSR foram convertidos em dados binários, onde se atribuiu valor “um” para presença e valor “zero” para ausência de bandas. Os marcadores que se mostraram polimórficos foram submetidos à análise de diversidade genética, utilizando como método de agrupamento o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e coeficiente de Jaccard. O ajuste entre a matriz de distâncias e o dendrograma foi realizado por meio de correlação cofenética (cc) utilizando o software Genes (CRUZ, 2006). Para obtenção do dendrograma de dissimilaridade foi utilizado o programa Statistica 7.1 (MINGOTI, 2005). Foi adotado como ponto de corte no dendrograma o ponto de maior salto das distâncias em função para a caracterização dos grupos, fornecido pelo programa Statistica 7.1.

## Resultados e Discussão

Os dez *primers* selecionados, apresentaram polimorfismos, gerando um total de 60 bandas entre 120 e 1300 pb, das quais 7 foram monomórficas e 53 polimórficas, obtendo-se um valor médio total de 88,3% de polimorfismo entre os genótipos avaliados. O número total de bandas variou de 1-9, com uma média de 6 bandas por iniciador (Tabela 3). Silva et al. (2011) também encontraram um alto valor de polimorfismo em espécies de *Manihot* utilizando 20 oligonucleotídeos ISSR, obtendo um total de 89,7%.

**Tabela 3** - Lista de primers ISSR, número total de bandas (NTB), número de bandas monomórficas (NBM), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P%) e amplitude de fragmentos (AF) em 15 genótipos de *Manihot*.

Primer	Bandas				
	NTB	NBM	NBP	P (%)	AF (pb)
TriCAC3'YC	6	1	5	83,3	250-900
TriCAC5'CR	8	5	3	37,5	350-1000
TriCAC5'CY	8	1	7	87,5	400-1000
TriTGT	1	0	1	100,0	800
TriAAC3'RC	4	0	4	100,0	400-1300
TriACA3'RC	9	0	9	100,0	250-900
DiGA5'CR	9	0	9	100,0	120-600
DiGA3'T	5	0	5	100,0	200-650
DiGA3'YC	5	0	5	100,0	120-900
DiGA	5	0	5	100,0	300-700
Total	60	7	53	88,3	
Média	6	0,7	5,3	90,8	

Coelho et al. (2016) também utilizando marcadores ISSR em *Passiflora cincinnata*, *Passiflora edulis* e um híbrido interespecífico (*P. edulis* x *P.*

*cinnata*) obtiveram uma porcentagem de polimorfismo de 74,8%. Contudo, os resultados obtidos com ISSR apresentaram pouco polimorfismo entre os parentais e o híbrido analisado.

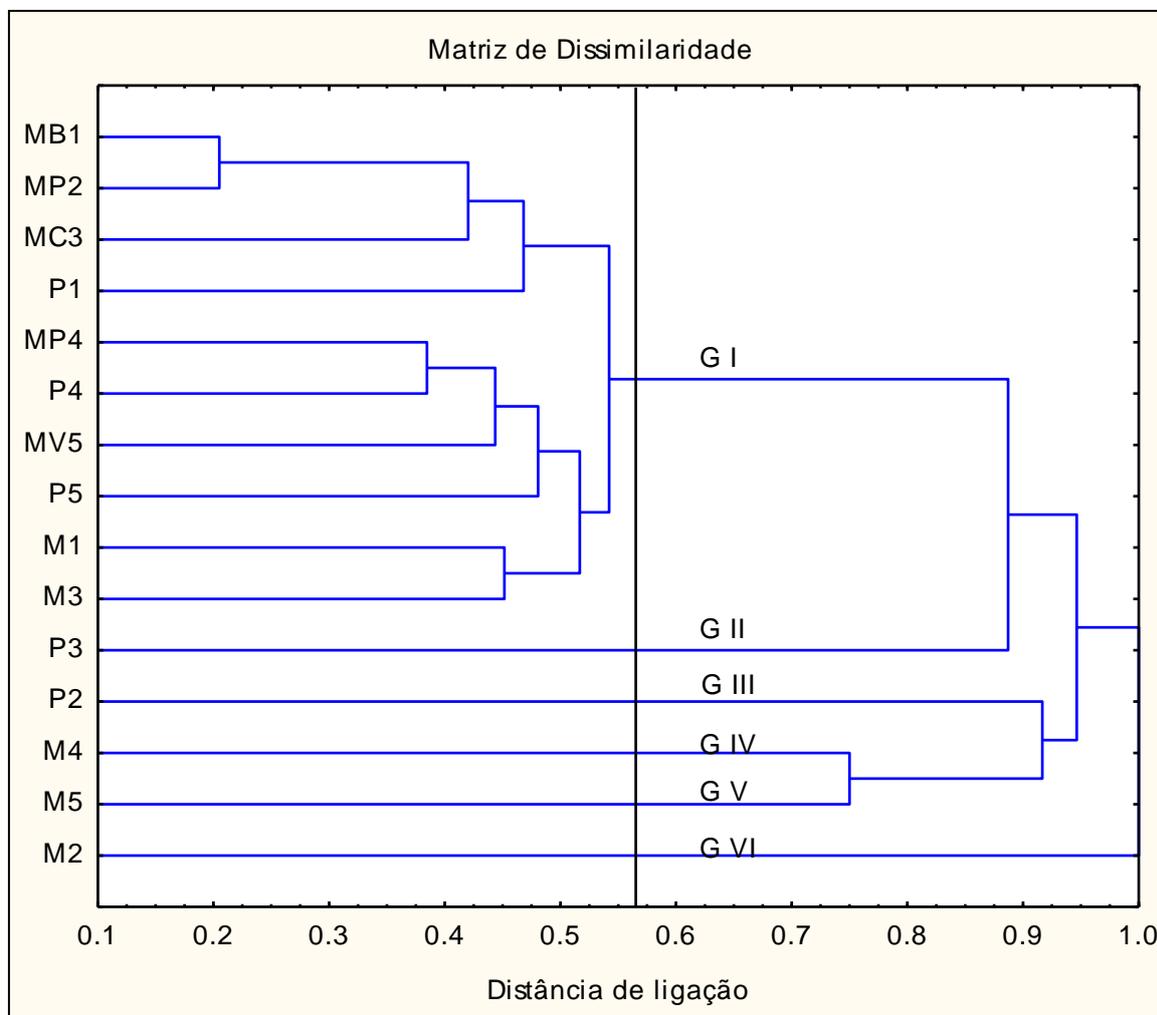
O número mínimo de bandas polimórficas (uma banda) foi obtido apenas para o primer TriTGT. Um número máximo de 9 bandas polimórficas foi obtido a partir dos primers TriACA3'RC e DiGA5'CR, gerando um percentual de 100% de polimorfismo (Tabela 3). A elevada porcentagem de bandas polimórficas encontrada (acima de 80%) ressalta que há variabilidade genética entre os acessos de *Manihot*.

Os valores de dissimilaridade genética (dg) entre todos os acessos variaram de 0,21 (acessos MB1 e MP2) a 1,0 (acessos MB1 e P2), com valor médio de 0,61. Por meio da análise de agrupamento foi possível observar a formação de seis grupos distintos (Figura 1). O grupo 1 (G1) foi formado por genótipos de três espécies em estudo, com os cinco acessos de mandioca (MB1, MP2, MC3, MP4 e MV5), com duas maniçobas (M1 e M3) e três porneças (P1, P4 e P5) (Figura 1). Os demais acessos encontram-se cada um em um grupo distinto (M2, M4, M5 e P2, P3). No grupo G1, a porneça está agrupada juntamente com seus prováveis parentais, mostrando que essas três espécies possuem similaridade entre si, com exceção dos acessos P2 e P3 de porneça, e M2, M4 e M5 de maniçoba.

Diversos estudos demonstram a variabilidade genética entre genótipos no gênero *Manihot*. Oliveira et al. (2012), por exemplo, utilizando marcadores moleculares microsátélites em dez clones de mandioca, observaram valores de similaridade que variavam de 0,15 a 0,75, indicando elevada variabilidade dos materiais utilizados. Siqueira et al. (2009) estimando a diversidade genética de 42 acessos de mandioca de cinco regiões brasileiras, e também utilizando marcadores microssátélites, constataram uma alta variabilidade genética com valores de 0,19 a 0,83.

A alta variabilidade pode ser explicada tanto devido a polinização cruzada como pela fixação da heterozigose na propagação vegetativa de diferentes acessos da cultura. Nesse caso, Oliveira et al. (2012) justificam que a elevada variabilidade ocorre pela utilização de clones com diferentes aptidões

comerciais. Da mesma maneira, podemos supor no nosso estudo que a alta variabilidade obtida pode ser devida às diferentes aptidões diversificadas dos genótipos.



**Figura 1** – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de 15 acessos de *Manihot* do Banco Ativo de Germoplasma e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot* da Embrapa Semiárido. Correlação cofenética ( $r \geq 0,97$ ).

Na Tabela 4 observamos a distribuição de bandas produzidas a partir de 10 *primers* para ISSR em três grupos de acessos do gênero *Manihot*: pornunças, maniçobas e mandiocas.

**TABELA 4** – Iniciadores ISSR utilizados na amplificação dos genótipos de *Manihot*, com suas respectivas sequências, número total de bandas (NTB), número de bandas monomórficas (NBM), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P%), número de bandas por genótipo (NBG) e amplitude de fragmentos (AF).

Primer	Sequência*	NBG														
		Mandiocas					Pornunças					Maniçobas				
		NTB	NBM	NBP	P (%)	AF (pb)	NTB	NBM	NBP	P (%)	AF (pb)	NTB	NBM	NBP	P (%)	AF (pb)
TriCAC3'YC	CACCACCACCACCACYC	5	2	3	60,0	250-900	5	1	4	80,0	250-900	4	2	2	50,0	800-900
TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC	8	6	2	25,0	350-1000	8	5	3	37,5	350-1000	7	6	1	14,3	350-1000
TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC	8	5	3	37,5	400-1000	8	7	1	12,5	400-1000	8	4	4	50,0	400-1000
TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT	1	0	1	100,0	800	-	-	-	-	-	1	0	1	100,0	800
TriAAC3'RC	AACAACAACAACAACRC	5	1	4	80,0	400-1300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TriACA3'RC	ACAACAACAACAACARC	7	0	7	100,00	250-800	8	0	8	100,0	200-800	2	0	2	100,0	450-900
DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA	5	2	3	60,0	120-450	6	1	5	83,3	150-450	7	2	5	71,4	150-600
DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	5	0	5	100,0	200-650	2	0	2	100,0	500-600	3	1	2	66,7	300-600
DiGA3'YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	4	1	3	75,0	150-500	2	1	1	50,0	120-220	3	1	2	66,7	220-900
DiGA	GAGAGAGAGAGAGAGA	4	3	1	25,0	300-700	3	2	1	33,3	400-600	-	-	-	-	-
Total		52	21	31	59,6		42	17	25	59,2		35	16	19	54,3	
Média		5,2	2,1	3,1	56,25		5,3	2,1	3,1	62,1		4,4	2,0	2,4	64,9	

\*R = A+G; Y = C+T

Na análise intraespecífica das mandiocas, observamos que quase todos os *primers* geraram bandas polimórficas, alguns com o número mínimo de uma banda polimórfica, tais como os *primers* TriTGT e DiGA, enquanto o *primer* TriAAC3'RC gerou o número máximo de 7 bandas (amplicons). O número total de bandas obtido para a mandioca foi de 52 bandas, sendo 21 monomórficas e 31 polimórficas, representando 59,6% de polimorfismo. Vale ressaltar que a amplitude máxima observada no número de bandas em *Manihot* variou de 1 a 8, tendo uma média de 5,2 bandas, com tamanhos variando de 120 a 1300 pb. Resultado próximo foi encontrado por VIDAI et al., (2015) utilizando-se 24 *primers* ISSR em diferentes genótipos de mandioca, onde se obteve um percentual de 57,1% de polimorfismo, enquanto no presente trabalho obtivemos 59,6%. Outros estudos também corroboram os resultados obtidos para mandioca, como os de VIEIRA et al., (2008), e VIEIRA et al., (2011).

Para as pornunças, oito dos dez *primers* produziram um total de 42 bandas, com um percentual de 59,2% de polimorfismo, sendo 25 bandas polimórficas e 17 monomórficas. O número de bandas variou de 2 a 8, com uma média de 5,3 bandas de tamanhos entre 120 e 1000 pb. Contudo, não foi possível obter amplicons com os *primers* TriTGT e TriAAC3'RC.

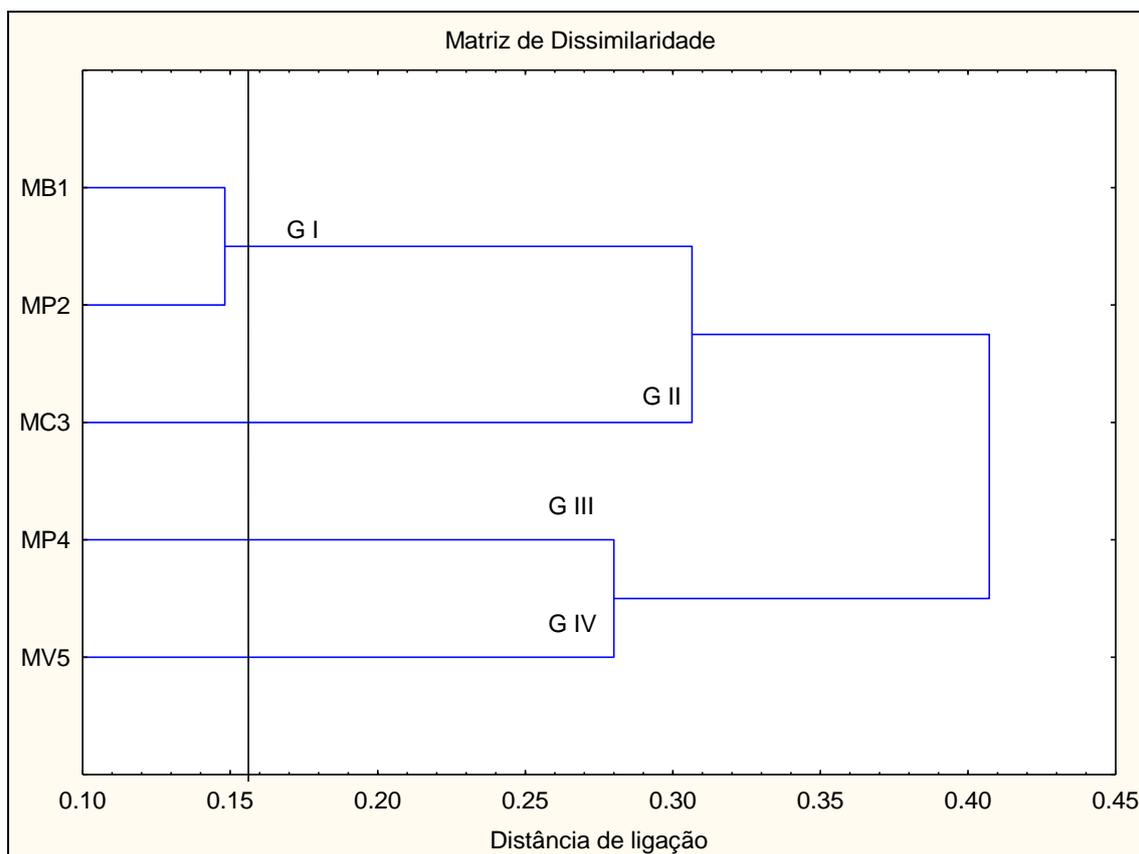
Nas maniçobas, nove *primers* produziram um total de 35 bandas com tamanhos variando de 150 a 1000 pb, das quais 19 (54,3%) foram polimórficas. O número de bandas variou entre 1 e 8, com valor médio de 4,4 bandas. Assim como observado nas pornunças, o *primer* TriAAC3'RC não produziu produto de amplificação.

De uma maneira geral observa-se que a percentagem de polimorfismo intragenérica (88,3%) é maior que a intraespecífica (54,3 a 59,6%). A detecção de polimorfismos intra e interespecíficos tem sido estudada utilizando-se os marcadores ISSR em diversas espécies nativas e cultivadas, como, por exemplo, em *Passiflora* (COSTA et al., 2012), *Eucalyptus* (BALLESTA; CONTRERAS-SOTO; PERRET, 2015) e *Manihot* (SILVA et al., 2011).

Observando valores de polimorfismo inter e intraespecíficos obtidos no presente estudo, constata-se que a percentagem de bandas polimórficas é maior entre espécies do que entre acessos da mesma espécie. Com a utilização de marcadores moleculares ISSR, Silva et al. (2011) avaliaram a diversidade genética intra e interespecífica entre acessos de *Manihot*,

observando que houve especificamente para estes genótipos uma maior similaridade entre *M. dichotoma* var. *undulata* e *M. caerulescens*, sendo maior do que a similaridade entre *M. dichotoma* e *M. dichotoma* var. *undulata*, identificadas como sendo da mesma espécie. Neste caso, esses autores afirmaram que há maior similaridade entre espécies diferentes de *Manihot*, do que entre indivíduos da mesma espécie.

No presente trabalho a maior divergência genética entre os acessos de mandioca foi entre MB1 e MV5 (0,46), e a divergência mais baixa foi entre os acessos MB1 e MP2 (0,15), com valor médio de 0,31. Foi possível observar a formação de quatro grupos distintos (Figura 2). O primeiro grupo (G I) foi formado pelos genótipos MB1 e MP2. O segundo, o terceiro e o quarto grupo foram formados cada um com apenas um genótipo (MC3, MP4 e MV5).

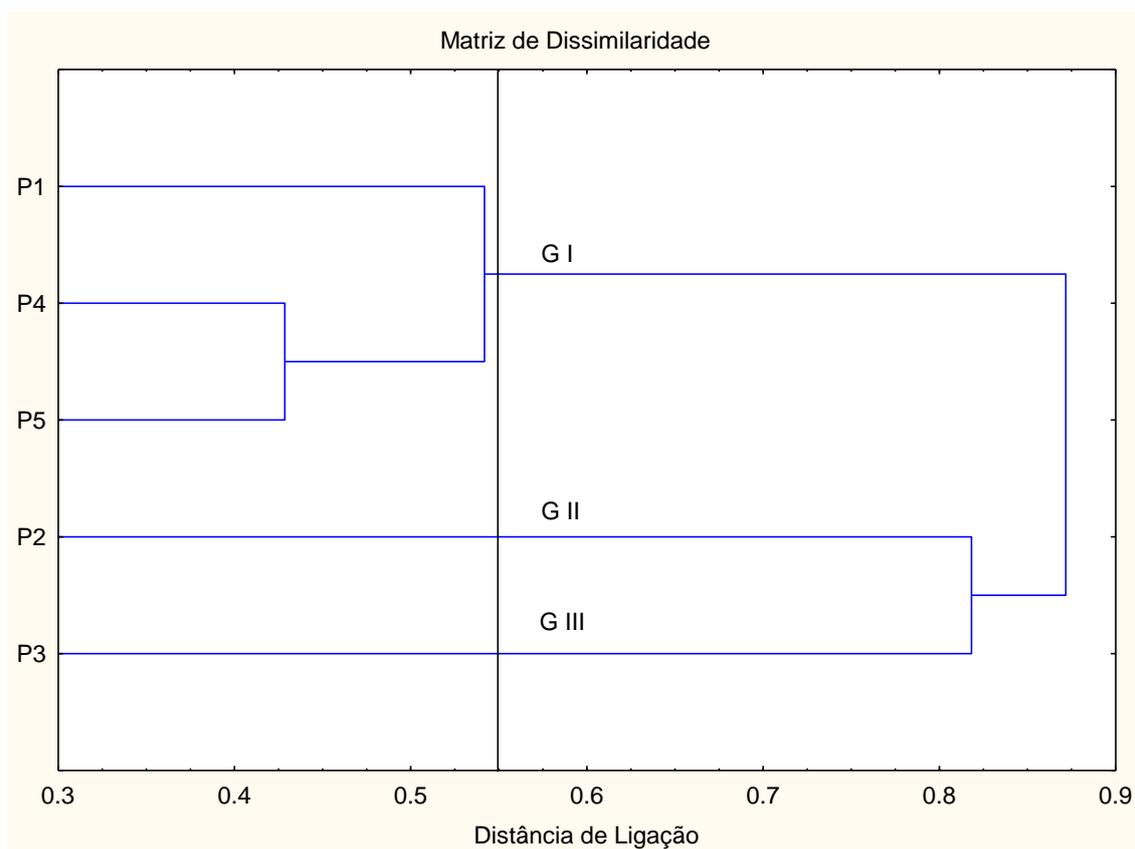


**Figura 2** – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de cinco acessos de mandioca do Banco Ativo de Germoplasma e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot* da Embrapa Semiárido. Correlação cofenética ( $r \geq 0,90$ ).

Zayed, Shams e Kamel (2013) utilizando marcadores moleculares ISSR mediram a distância genética de quatro genótipos de mandioca, sendo um da

Indonésia, um do Brasil e dois da Tailândia. Os autores encontraram maior dissimilaridade entre os genótipos do Brasil e da Indonésia (0,25) e menor dissimilaridade entre os genótipos da Tailândia e do Brasil (17,7). No nosso estudo, os acessos de mandioca mais similares encontram-se no estado da Bahia (MB1) e do Ceará (MP2), mostrando que mesmo sendo de locais diferentes, esses genótipos apresentam proximidade genética pelo critério adotado.

Para as pornunças os valores de dissimilaridade genética (dg) entre os cinco acessos tiveram uma variação de 0,43 (acessos P4 e P5) a 0,95 (acessos P1 e P2), com valor médio de 0,69. Por meio da análise de agrupamento foi possível observar a formação de três grupos distintos (Figura 3).

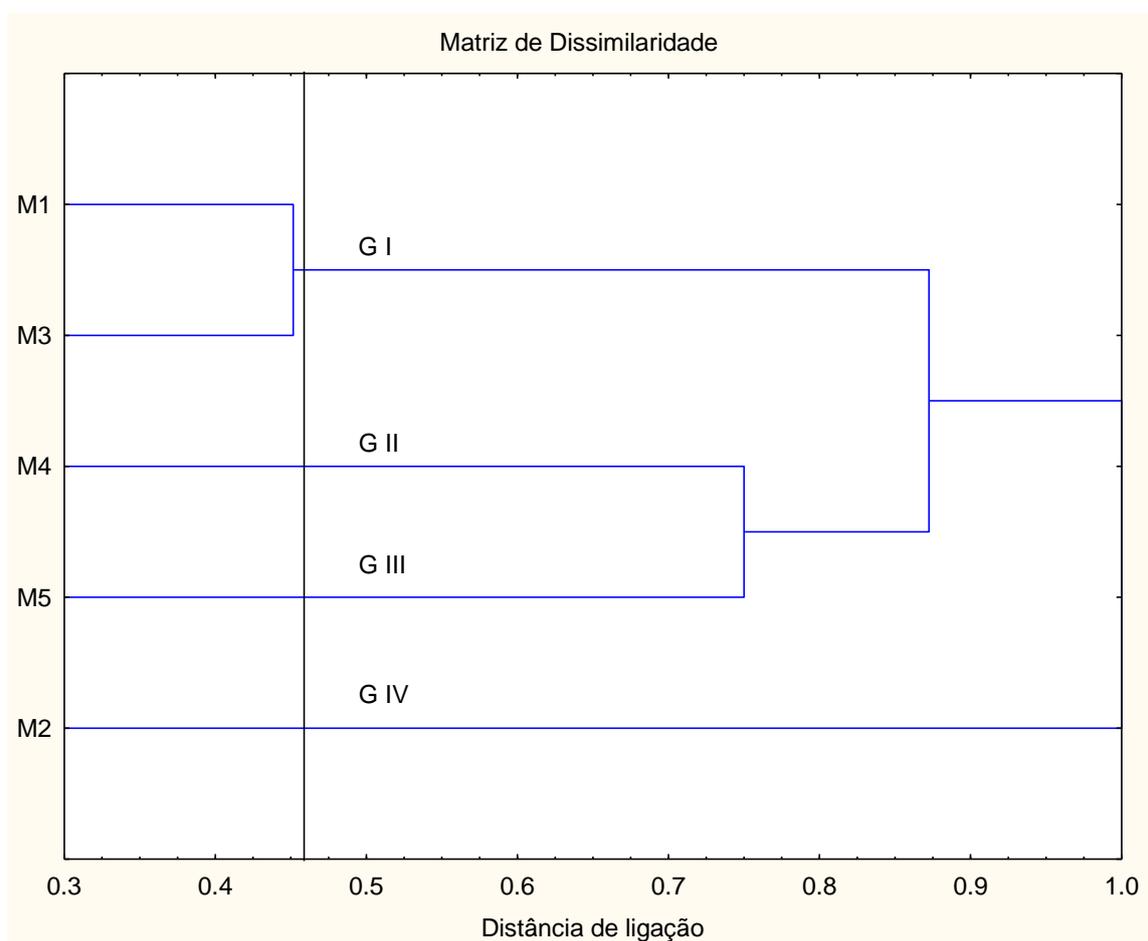


**Figura 3** – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de cinco acessos de pornunças do Banco Ativo de Germoplasma e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot* da Embrapa Semiárido. Correlação cofenética ( $r \geq 0,95$ ).

Segundo Nassar (2000) espécies silvestres de *Manihot* deram origem à mandioca, constituindo um valioso reservatório genético, com genes que

mostram novos caracteres. Sendo as pornunças e as maniçobas espécies silvestres, é interessante o estudo destes dois genótipos. No presente trabalho, os genótipos em questão apresentam alto percentual de polimorfismo em diferentes acessos do gênero *Manihot*, diferentemente deste resultado Costa, Cardoso e Ohaze (2003) obtiveram um percentual bem mais baixo, de 34,60% de polimorfismo. Também possuem grande diversidade genética intra e interespecífica.

A maior divergência genética entre os acessos de maniçobas foi entre M1 e M2 (1,0), e a divergência mais baixa foi entre os acessos M1 e M3 (0,45), com valor médio de 0,73. Foi possível observar a formação de quatro grupos distintos (Figura 4).



**Figura 4** – Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA e coeficiente de Jaccard de cinco acessos de maniçobas do Banco Ativo de Germoplasma e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot* da Embrapa Semiárido. Correlação cofenética ( $r \geq 1,0$ ).

Diferentemente das mandiocas e pornunças, na separação dos materiais de maniçobas, encontramos três espécies distintas: *M. pseudoglaziovii* (acessos M1, M2 e M3), mais comum e com distribuição mais abrangente, *M. carthagenensis* subsp. *glaziovii* (acesso M4) e *M. compositifolia* (acesso M5). Na matriz de dissimilaridade, apesar da formação de quatro grupos, mostra uma separação muito intensa entre os acessos M1 e M2 de *M. pseudoglaziovii*, quando comparada com a distância para as outras espécies. Uma possível razão para essa divergência é a origem do acesso M2, a qual foi coletada no estado do Ceará, enquanto os acessos M1 e M3 da mesma espécie foram oriundos do estado de Pernambuco. Vidal et al. 2015 afirmam que a eficiência dos marcadores ISSR é clara e revela a diversidade genética de *Manihot*, tanto entre genótipos da mesma espécie como entre espécies do mesmo gênero.

Os resultados obtidos com a caracterização molecular poderão ser utilizados em programas de melhoramento genético visando subsidiar o desenvolvimento de novas variedades. Nesse caso, os marcadores obtidos poderão ser úteis em hibridações interespecíficas que visem a transferência de características fenotípicas e de adaptações como as encontradas nos genótipos estudados.

## Conclusões

Os marcadores ISSR de microssatélites foram eficientes para avaliação da variabilidade genética dentro de genótipos de *Manihot*, devido ao elevado número de polimorfismo encontrado, sugerindo que as populações em estudo têm ampla base genética, que poderá auxiliar na implementação de estratégias mais eficientes a serem utilizadas no programa de melhoramento genético das espécies.

## Referências

BALLESTA, P.; CONTRERAS-SOTO, R. L.; PERRET, S. Analysis of the genetic diversity of *Eucalyptus cladocalyx* (sugar gum) using ISSR markers. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 2, p. 133-140, 2015.

BORBA, R. S.; GARCIA, M. S.; KOVALESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S.C.; MALONE, G. Systematics, morphology and physiology: Dissimilaridade Genética de Linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Através de Marcadores Moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

COELHO, M. S. E.; BORTOLETI, K. C. A.; ARAÚJO, F. P.; MELO, N. F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parents. **Euphytica**, Wagening, v. 210, p. 93-104, 2016.

COSTA, J. L.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit, Crop Breeding and Applied. **Biotechnology**, v. 12, p. 253-260, 2012.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p.158-164, 2003.

CRUZ, C.D. **Programas GENES-versão Windows 2009.7**. Editora UFV, Viçosa, p. 642, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue, **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. 297 p.

NASSAR, N. M. A. Wild Cassava, *Manihot* spp.: Biology and Potentialities for Genetic Improvement. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.23, n.1, p. 201-212, 2000.

NASSAR, N. M. A.; ORTIZ, R. Cassava improvement: challenges and impacts. **Journal of Agricultural Science**, v. 145, p. 163–171. 2007.

OLIVEIRA, M. V. C.; BALIZA, D. P.; SOUZA, G. A.; CARVALHO, S. P.; ASSIS L. H. B. Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microssatélites. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 1, p. 170-176, 2012.

SAGRILO, E.; FILHO, P. S. V.; OTSUBO, A. A.; SILVA, A. S.; ROHDEN, V. S. Performance de cultivares de mandioca e incidência de mosca branca no Vale do Ivinhema, Mato Grosso do Sul. **Revista. Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 1, p. 087-094, 2010.

SILVA, A. F.; SANTOS, A. P. G.; OLIVEIRA, A. P. D.; MORAES, S. A.; SANTANA, SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

SIQUEIRA, M. V. B. M.; QUEIROZ-SILVA, J. R.; BRESSAN, E. A.; BORGES, A.; PEREIRA, K. J. C.; PINTO, J. G.; VEASEY, E. A. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 104-110, 2009.

VIDAL, Á.M.; VIEIRA, L.J.; FERREIRA, C.F.; SOUZA, F.V.D.; SOUZA, A. S.; LEDO, C.A.S. Genetic fidelity and variability of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) evaluated using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 14 n. 3, p. 7759-7770, 2015.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON G.; FONSECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, M. S. Molecular characterization and genetic variability of elite cassava accessions for industrial purpose. **Ciência Rural**, 2010.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, M. S.; PAULA-MORAES S. V.; FILHO, M. O. S. S.; SILVA, K. N. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1707-1715, 2008.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. O. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B. Molecular characterization of sugary and non-sugary cassava accessions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 455-461, 2011.

ZAYED, E. M.; SHAMS, A. S.; KAMEL, A. S. Genetic diversity in introduced cassava using inter simple sequence repeat markers (issrs). **Geneconserve**, n. 12, v.47, p. 23-33, 2013.

## CAPÍTULO 3

### 5. Coloração diferencial CMA/DAPI de cromossomos mitóticos e viabilidade polínica em acessos de *Manihot*

#### Resumo

O gênero *Manihot* possui aproximadamente 100 espécies, com grande diversidade, sendo a maioria encontrada no Brasil. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o padrão de heterocromatina e analisar a viabilidade de grãos de pólen em oito genótipos de *Manihot*. Para isso, foram analisados nove acessos de *Manihot* entre mandiocas, maniçobas e pornunças, por meio da coloração CMA/DAPI, e a viabilidade polínica utilizando a coloração com carmim acético. Foi observado  $2n=36$  cromossomos para todos os acessos. A coloração com fluorocromos CMA/DAPI revelou regiões heterocromáticas CMA<sup>+</sup>, cujo número de blocos variou de seis a oito nos acessos de mandioca e de maniçoba, e de seis a doze nas pornunças. A viabilidade polínica foi realizada em quatro acessos de maniçoba e quatro acessos de pornunça. Todos os acessos apresentaram viabilidade polínica acima de 80%. O diâmetro médio dos grãos de pólen viáveis apresentou valores acima de 100  $\mu\text{m}$ . Os acessos de maniçoba e de pornunça apresentam viabilidade polínica alta, podendo ser recomendados como genótipos doadores de pólen em trabalhos de pesquisa com melhoramento genético. Entretanto, enquanto o diâmetro dos grãos de pólen da maniçoba não apresentou variação significativa, os de pornunça são bastante variáveis, sendo um indicativo de possíveis anormalidades meióticas devidas a hibridações anteriores.

**Palavras-chave:** Citogenética. Mandioca. Maniçoba. Pornunça.

#### Abstract

The genus *Manihot* has about 100 species, with higher diversity, mostly found in Brazil. This study aims to characterize the pattern of heterochromatin and analyze the viability of pollen grains in eight genotypes of *Manihot*. For this intent, nine *Manihot* accessions among cassava, maniçobas and pornunças were analyzed by CMA/DAPI staining, as well as the pollen viability staining using acetic carmine. It was observed  $2n = 36$  chromosomes for all access. Staining with fluorochromes CMA / DAPI revealed heterochromatic regions CMA<sup>+</sup>, where the number of blocks ranged from six to eight in cassava and maniçoba accessions, and from six to twelve in pornunças. Pollen viability was performed in four accessions of maniçoba and four pornunça. All accessions showed pollen viability above 80%. The mean diameter of viable pollen grains showed values above 100 micrometers. The maniçoba and pornunça accesses have high pollen viability, and can be recommended as pollen donor genotypes in research work on genetic breeding programs. However, as the

diameter of pollen grains of maniçoba did not change significantly, the porunça are quite variable, being indicative of possible meiotic abnormalities due to previous hybridizations.

**Key-words:** Cytogenetics. Cassava. Maniçoba. Porunça.

## Introdução

Na família Euphorbiaceae, o gênero *Manihot* se destaca pela complexidade taxômica, possuindo em torno de 100 espécies com distribuição desde a região do Texas no EUA até a Argentina. No Brasil, em especial, há uma região considerada como centro de diversidade do táxon dessas espécies, principalmente na região do Planalto Central (ORLANDINI e LIMA, 2014).

Citogeneticamente, o gênero *Manihot* apresenta pouca variação cromossômica numérica (CARVALHO e GUERRA, 2002; CARVALHO; GUERRA; CARVALHO, 1999). Carvalho e Guerra (2002), por exemplo, estudando 47 acessos do gênero *Manihot*, observaram  $2n=36$  cromossomos em todos os acessos investigados, inclusive apresentando cariótipos similares. Alguns estudos envolvendo coloração diferencial da cromatina, revelaram seis a oito bandas CMA+, seis sítios de DNAr 45S e dois sítios de DNAr 5S (CARVALHO E GUERRA, 2002). De uma maneira geral, os cromossomos em *Manihot* apresentam condensação prómetafásica proximal, observando-se cromatina com condensação tardia nas regiões mais distais. Em muitas dessas regiões são observados alguns blocos de heterocromatina associados às regiões de condensação tardia.

Espécies de *Manihot* possuem também um fraco isolamento reprodutivo, permitindo a hibridação interespecífica natural, como possivelmente ocorreu com a porunça (JENNINGS, 1963; NASSAR et al., 1995). Alguns híbridos são férteis e possuem características importantes como baixo teor de ácido cianídrico e resistência a pragas, doenças e à seca, podendo ser utilizados para transferência de genes para espécies em cultivo (JENNINGS 1976).

Apesar da facilidade para hibridação interespecífica, há pouca informação sobre a viabilidade dos grãos de pólen de espécies silvestres de *Manihot*. Estudos sobre a viabilidade polínica são necessários e importantes

para programas de melhoramento genético, pois podem subsidiar e direcionar futuros cruzamentos entre as espécies do gênero, tanto as cultivadas como as silvestres e os possíveis híbridos naturais já existentes (VIEIRA et al. 2012). Nesse caso, há uma série de métodos colorimétricos para estimar a viabilidade dos grãos de pólen, dentre eles a coloração com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), Alexander, carmim acético, lugol, Sudan IV, entre outros (MUNHOZ et al., 2008).

No presente trabalho foram realizadas análises com coloração fluorescente diferencial em cromossomos mitóticos de *M. esculenta*, *M. Pseudoglaziovii*, *Manihot compositifolia* Allem e *Manihot* spp., com o objetivo de caracterizar o padrão de heterocromatina das espécies. Também foram realizadas análises da viabilidade de grãos de pólen em oito genótipos, sendo quatro de *M. pseudoglaziovii* e quatro de *Manihot* spp.

## **Material e métodos**

### Local de condução e Material vegetal

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Foram utilizados acessos de pornunça (*Manihot* spp.), mandioca (*Manihot esculenta* Cranz), maniçoba (*M. pseudoglaziovii* Muell. Arg.), e da espécie silvestre *Manihot compositifolia* Allem oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca e da Coleção de Trabalho de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot* da Embrapa Semiárido. Foram utilizados três acessos de cada espécie em estudo, com exceção da espécie *M. compositifolia* Allem, onde só foi analisado um acesso (Tabela 1). Para as análises de viabilidade polínica, só foi possível obter grãos de pólen de quatro acessos de maniçoba e quatro de pornunça.

As plantas enraizadas em substrato (vermiculita+solo+areia, 1:1:1) foram mantidas em vasos de cultivo no viveiro de mudas da Embrapa Semiárido, visando obter raízes para análise citogenética. Os botões florais para a análise de viabilidade polínica foram coletados em plantas estabelecidas em campo.

**Tabela 1** – Identificação, nome comum e científico, origem, utilização, e código de nove acessos de *Manihot* utilizados para estudo citogenético e de viabilidade polínica.

Símbolos	Acesso	Nome comum e/ou nome científico	Origem	Utilização	Procedência
MB1	MB1	Mandioca ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	Petrolina - PE	Brava/farina	CESGM
MP2	BAG 435	Macaxeira do Pará ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	Crateús - CE	Mansa/in natura	BAGES
MV5	BAG 438	Mandioca Vermelhinha ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	Crateús - CE	Brava/farina	BAGES
P1	P1	Pornunça ( <i>Manihot</i> spp.)	Petrolina - PE	FORAGEM	CESGM
P2	P3	Pornunça ( <i>Manihot</i> spp.)	Petrolina - PE	FORAGEM	CESGM
P4	P4	Pornunça ( <i>Manihot</i> spp.)	Petrolina - PE	FORAGEM	CESGM
M1	Caatinga - PE	Maniçoba ( <i>M. pseudoglaziovii</i> Muell. Arg.)	Petrolina - PE	FORAGEM	CESGM
M3	BGMS115	Maniçoba ( <i>M. pseudoglaziovii</i> Muell. Arg.)	Petrolina PE	FORAGEM	BAGES
M5	BGMS22	<i>Manihot compositifolia</i> Allem	Cruz das Almas - BA	FORAGEM	BAGES

\*BAGES = Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido; CESGM = Coleção de Espécies Silvestres do Gênero *Manihot*.

### Análises citogenéticas

Pontas de raízes foram coletadas preferencialmente pela manhã e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 0,002 M por 20-24 horas à aproximadamente 6-8°C na geladeira, e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial, v/v), sempre preparado imediatamente antes do uso, agitando algumas vezes. Após a fixação, as raízes foram mantidas por 2-24 horas à temperatura ambiente, em seguida, estocadas no freezer em -20 °C para utilização nas análises conforme Guerra e Souza (2002) com pequenas modificações.

As raízes foram digeridas em solução enzimática (2% celulase - 20% pectinase) por 5h a 37 °C em estufa, esmagadas em uma gota de ácido acético 45% e cobertas por uma lamínula 18x18 mm, sendo retirada após congelamento em nitrogênio líquido. Quando necessário, as lâminas foram congeladas no freezer a - 20 °C para posterior utilização.

Para seleção das melhores lâminas, foi feita uma coloração com DAPI-glicerol (1 µg mL<sup>-1</sup>) e análise em microscópio de epifluorescência Leica DMLB. Posteriormente as lâminas selecionadas foram descoradas em Carnoy 3:1

(etanol: ácido acético glacial, v/v) durante 30 minutos, sendo em seguida desidratadas em álcool 70% e álcool 92% durante um minuto cada. As lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias, e quando necessário, antes do envelhecimento foram armazenadas no freezer.

Posteriormente as lâminas foram coradas com CMA (cromomicina 0,5 mg mL<sup>-1</sup>) por 1 h, contra coradas com DAPI (2 µg mL<sup>-1</sup>) por 30 min, montadas em meio de montagem Macllvaine e guardadas por mais três dias no escuro à temperatura ambiente (GUERRA e SOUZA, 2002). As melhores células foram capturadas em microscópio de epifluorescência Leica DMLB, utilizando uma câmera digital FX350 por meio do Software Leica QFISH.

Para a identificação do número de cromossomos e bandeamento, 3-10 metáfases foram examinadas por indivíduo, sendo usados três indivíduos por genótipo, utilizando as melhores células para a contagem.

### Viabilidade polínica

Para o estudo da viabilidade polínica dos acessos de pornuença e maniçoba, flores masculinas em máximo grau de maturação e pré-antese foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 por 5 a 24 horas a temperatura ambiente, sendo estocados -20 °C até sua utilização. As anteras das flores foram retiradas, obtendo-se os grãos de pólen, os quais foram corados com carmim acético a 2% (GUERRA e SOUZA, 2002) visando sua coloração e visualização com auxílio de uma câmera digital DinoEye.

As imagens de pelo menos 500 grãos de pólen por genótipo foram capturadas e analisadas pelo software Dinocapture 2.0. O grão de pólen que se apresentou de forma circular, grande e corado homogeneamente, num tom vermelho intenso, foi considerado viável. Os grãos de pólen com coloração e morfologia diferentes foram considerados inviáveis. Além da contagem dos grãos de pólen e do cálculo da porcentagem de viabilidade, foram feitas as medições dos seus diâmetros vertical e horizontal.

## **Resultados e Discussão**

### Análise de células mitóticas

Para todos os acessos analisados de *Manihot* foram encontrados  $2n=36$  cromossomos. Este número confirma vários relatos descritos anteriormente em outros trabalhos realizados com o gênero (MAGOON; KRISHNAN; VIJAYA BAI, 1969; NASSAR, 1977; CARVALHO e GUERRA, 2002). Cruz (1968), por exemplo, encontrou  $2n=36$  em 15 acessos de mandioca provenientes de várias regiões do Brasil. Nassar, Hashimoto e Ribeiro (2010), estudando um híbrido interespecífico diplóide, relataram o mesmo resultado ( $2n=36$ ), demonstrando a pouca variabilidade numérica mesmo em híbridos do gênero.

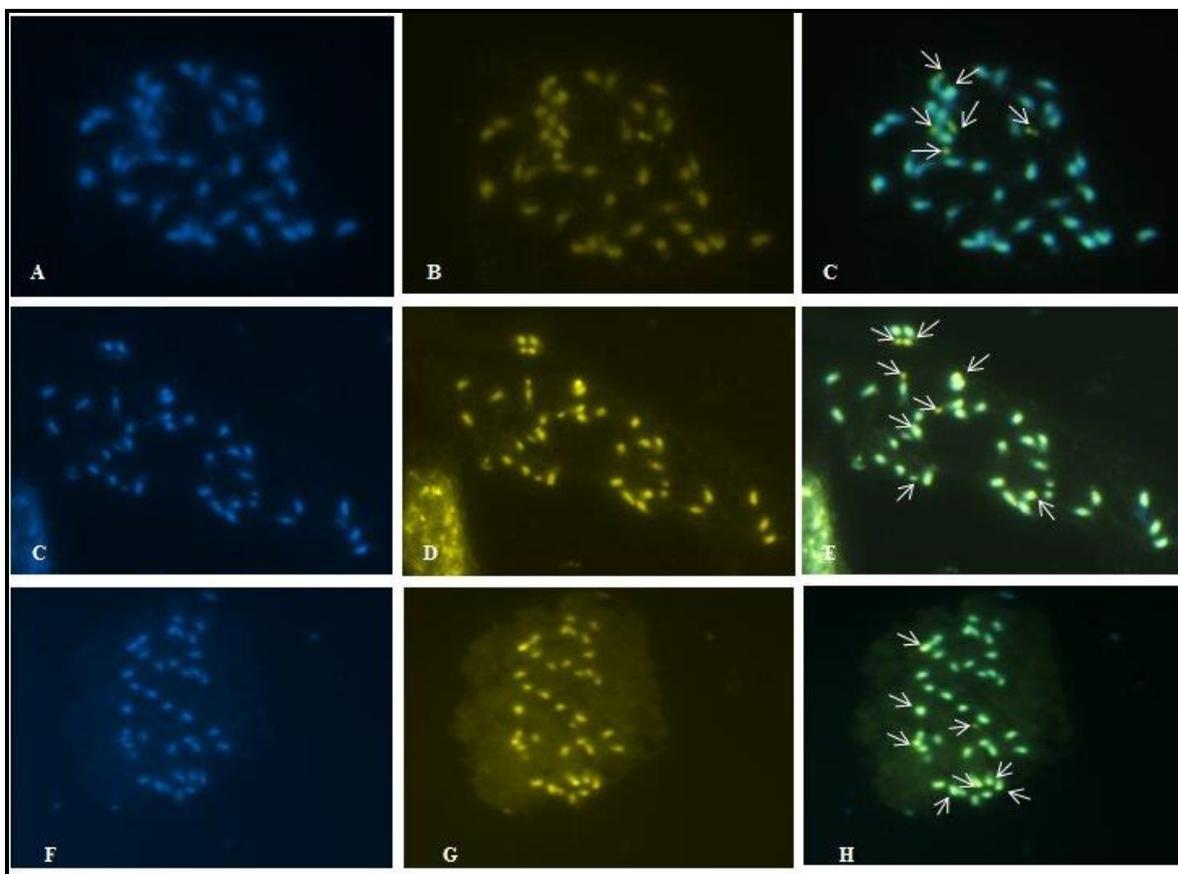
Diferentemente dos resultados anteriores existem alguns relatos que mostram números diferentes de cromossomos. Em *Manihot esculenta* 'Manipeba', foram observados  $2n=54$ , sendo esse genótipo considerado um triploide espontâneo (CARVALHO; GUERRA; CARVALHO, 1999). Além deste trabalho, foi relatado outros dois poliplóides naturais de mandioca, onde também se encontrou  $2n=54$ , atribuindo-se sua origem também a uma triploidia espontânea (SARDOS et al., 2009).

Para a maioria dos acessos, a dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI permitiu visualizar seis a oito blocos de  $CMA^+$  na região terminal dos cromossomos, principalmente para a mandioca e para a maniçoba, possivelmente relacionados à região organizadora dos satélites. Na pornunça foi encontrado de seis a doze bandas de  $CMA^+$  (Figura 1).

Os pequenos blocos mais brilhantes com coloração CMA confirmam a existência de uma pequena porção de cromatina com coloração diferencial rica em pares de base GC (Figura 1). A constância no padrão de condensação e no número de cromossomos sugere que todos os acessos de *Manihot*, compartilham um cariótipo comum e estável. Entretanto, o número de blocos  $CMA^+$  sugere uma maior divergência entre as pornunças do que mandiocas e maniçobas.

Carvalho e Guerra (2002) avaliando diferentes acessos de *Manihot*, utilizando fluorocromos CMA/DAPI, encontraram cromossomos com oito bandas  $CMA^+$ , sendo quatro destas coincidindo com os satélites. Vasconcelos et al. (2010) avaliando genótipos de mamona utilizando a coloração CMA/DAPI também obtiveram bandas positivas ricas em GC ( $CMA^+$ ).

A utilização do bandeamento cromossômico através dos fluorocromos CMA e DAPI tem se mostrado muito informativo, gerando informações quanto a variabilidade e heteroziguidade durante a avaliação e caracterização da origem de híbridos (GUERRA 1993; CARVALHO et al., 2005).



**Figura 1.** Coloração DAPI (A, C e F), CMA (B, D e G) e dupla coloração CMA/DAPI (C, E e H) em metáfases mitóticas com  $2n=36$  em acessos de *Manihot*. A-C mandioca (acesso MB1), D-E maniçoba (acesso M1), F-H pornunça (acesso P4). Setas indicam regiões de cromatina mais brilhantes com coloração CMA.

### Viabilidade polínica

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados obtidos para a estimativa de viabilidade dos grãos de pólen e seus respectivos diâmetros médios nos acessos de maniçobas e pornunças.

Os acessos de maniçoba apresentaram um alto potencial de viabilidade polínica, com valores médios acima de 98%, destacando-se os acessos 3 e 4 com 100% de viabilidade (Tabela 2). Vieira et al. (2012) avaliando a viabilidade

polínica de espécies do gênero *Manihot* com carmim acético, encontraram valores semelhantes, com porcentagens de viabilidade variando de 75% a 98%. Vale salientar que de acordo com Hister e Tedesco (2016), viabilidade polínica com valores inferiores a 70% é considerada baixa, podendo trazer problemas de infertilidade.

Para a pornunça foram obtidos valores de viabilidade variando de 83% a 94%, mostrando que esse genótipo pode ser utilizado em hibridações para o melhoramento genético interespecífico (Tabela 3).

**Tabela 2.** Percentual de viabilidade polínica e diâmetro médio de grãos de pólen de diferentes acessos de maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii* Muell. Arg.) cultivados no Vale do São Francisco.

Acessos	Grãos de pólen viáveis (%)	Grãos de pólen inviáveis (%)	Grãos de pólen viáveis Diâmetro Vertical (Diâmetro $\pm$ DP $\mu$ m)	Grãos de pólen viáveis Diâmetro Horizontal (Diâ metro $\pm$ DP $\mu$ m)	Grãos de pólen inviáveis Diâmetro Vertical ( $\mu$ m)	Grãos de pólen inviáveis Diâmetro Horizontal ( $\mu$ m)
M1	99,0	1,0	130,07 $\pm$ 3,86	131,25 $\pm$ 4,30	84,26	85,62
M2	98,0	2,0	124,28 $\pm$ 3,21	125,85 $\pm$ 3,31	88,33 $\pm$ 9,51	89,01 $\pm$ 6,11
M3	100,0	0,0	128,33 $\pm$ 2,81	129,58 $\pm$ 2,43	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
M4	100,0	0,0	123,74 $\pm$ 5,72	124,50 $\pm$ 5,56	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

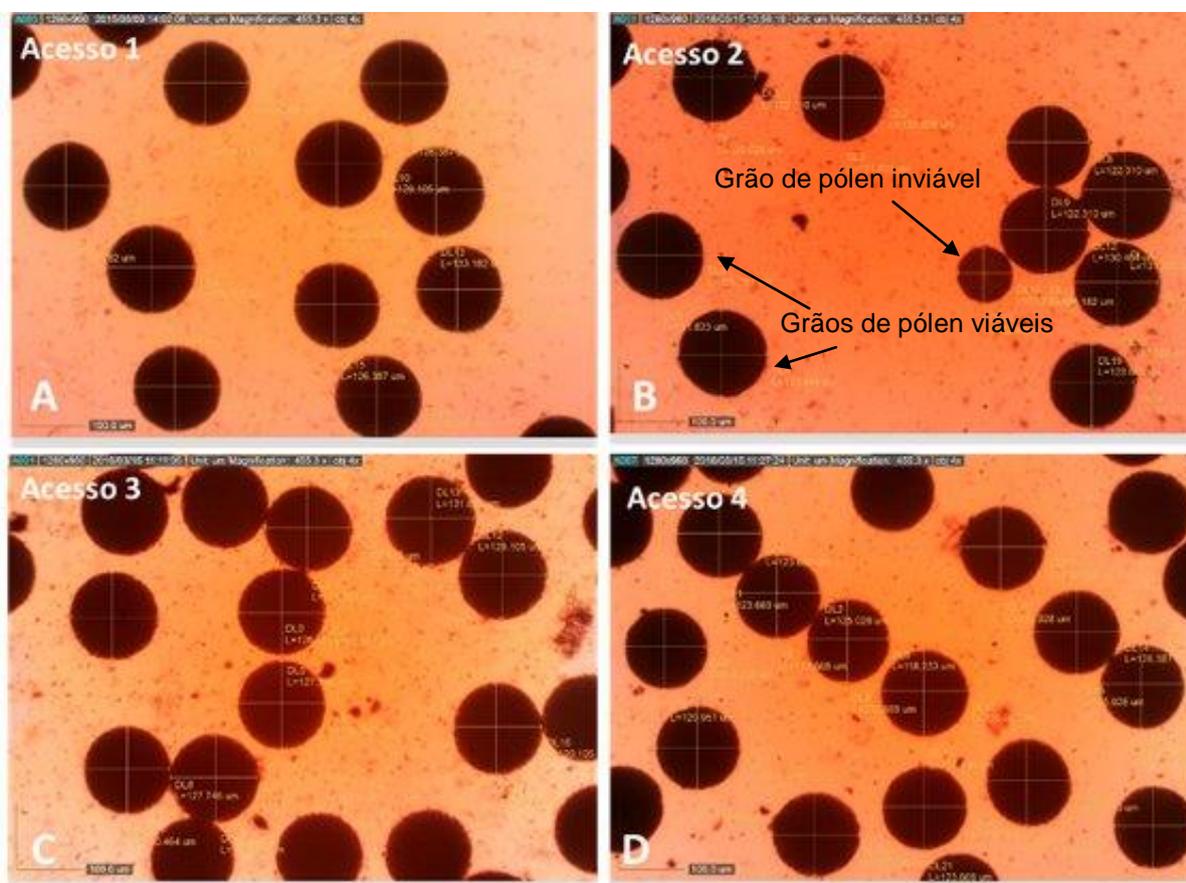
**Tabela 3.** Percentual de viabilidade polínica e diâmetro médio de grãos de pólen de acessos de pornunça (*Manihot* spp.) cultivados no Vale do São Francisco.

Acessos	Grãos de pólen viáveis (%)	Grãos de pólen inviáveis (%)	Grãos de pólen viáveis Diâmetro Vertical (Diâmetro $\pm$ DP $\mu$ m)	Grãos de pólen viáveis Diâmetro Horizontal (Diâmetro $\pm$ DP $\mu$ m)	Grãos de pólen inviáveis Diâmetro Vertical ( $\mu$ m)	Grãos de pólen inviáveis Diâmetro Horizontal ( $\mu$ m)
P1	88,0	13,0	107,53 $\pm$ 14,55	107,74 $\pm$ 14,94	36,17 $\pm$ 8,15	35,75 $\pm$ 8,13
P2	94,0	6,0	112,91 $\pm$ 17,05	113,77 $\pm$ 16,69	43,04 $\pm$ 7,79	43,71 $\pm$ 8,79
P3	83,0	17,0	110,96 $\pm$ 18,26	112,08 $\pm$ 18,46	40,53 $\pm$ 6,46	41,73 $\pm$ 6,77

P4	83,0	17,0	116,06 ± 19,54	118,05 ± 18,85	38,45 ± 7,71	39,25 ± 7,56
----	------	------	-------------------	-------------------	-----------------	-----------------

Com relação ao diâmetro dos grãos de pólen e considerando-se o desvio padrão, observa-se que não houve diferença de tamanho entre os acessos de maniçoba, cujos valores das médias variaram de 123,74  $\mu\text{m}$  a 130,07  $\mu\text{m}$  no diâmetro vertical e 124,50  $\mu\text{m}$  a 131,25  $\mu\text{m}$  para as médias do diâmetro horizontal, para os grãos de pólen viáveis, e de 84,25  $\mu\text{m}$  a 88,33  $\mu\text{m}$  (vertical) e 85,62  $\mu\text{m}$  a 89,01  $\mu\text{m}$  (horizontal) no caso dos inviáveis (Tabela 2).

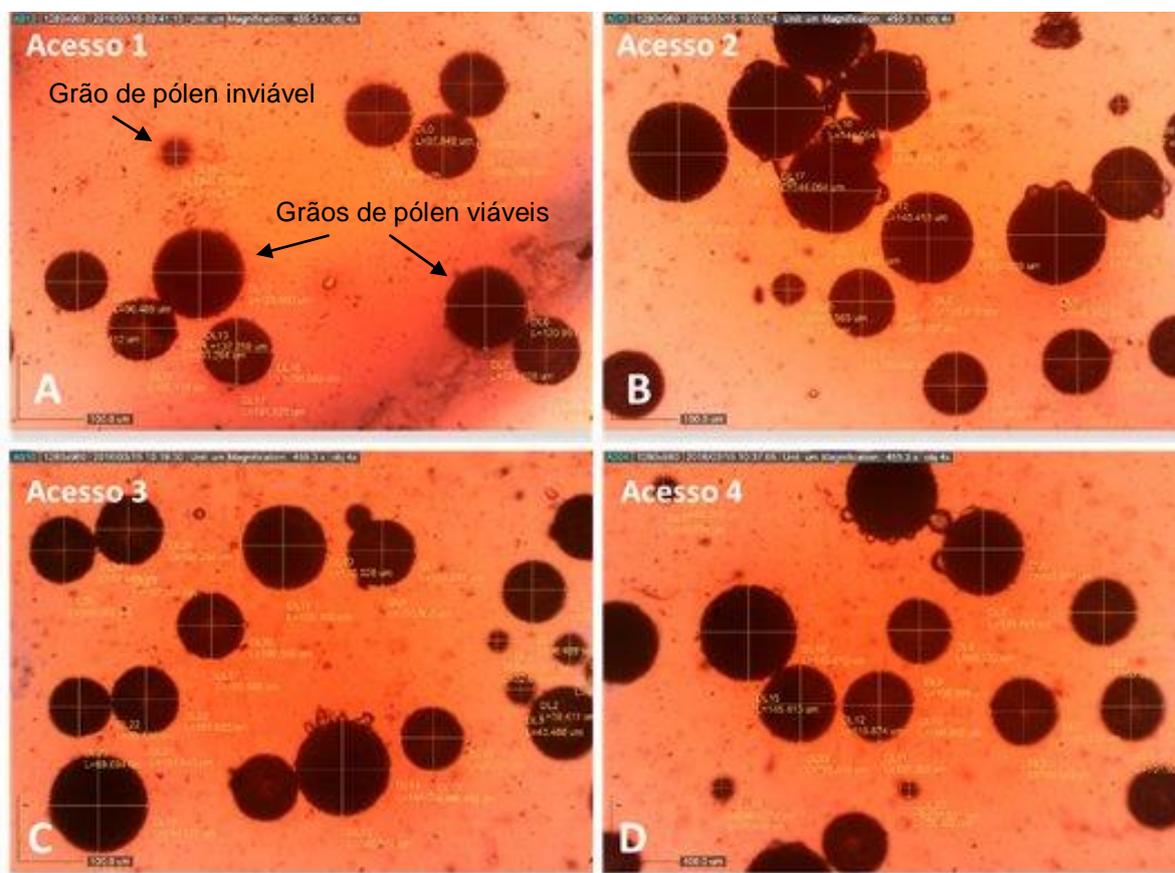
Pode-se observar que os grãos de pólen dessa espécie apresentaram um formato ligeiramente ovalado e sendo bastante homogêneos, com o diâmetro horizontal apresentando valores maiores em relação ao vertical, como pode ser observado na Figura 2. Esses tamanhos de grãos de pólen estão de acordo com alguns relatos, como, por exemplo o estudo de Vieira et al. (2012), onde todos os acessos de *Manihot* apresentaram grãos de pólen com com diâmetros maiores que 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.** Grãos de pólen corados com carmim acético de quatro acessos de maniçoba cultivadas no Vale do São Francisco. Coloração mais intensa e maior diâmetro indicam grãos de pólen viáveis, enquanto que coloração clara e menor diâmetro estão relacionados a grãos de pólen inviáveis. Valores das medições estão em micrômetros.

O tamanho dos grãos de pólen e a capacidade de produção são características importantes, podendo ser fatores que influenciam no comportamento reprodutivo de diferentes espécies, afetando diretamente o fluxo gênico. Essas informações são importantes quando aplicados tanto para seleção de plantas-mãe para hibridações interespecíficas, como também no estudo taxonômico, permitindo a avaliação sobre os potenciais de cruzamento entre as espécies (WILLIAMS e ROUSE, 1990; VIEIRA et al., 2012).

Considerando o diâmetro médio e desvio padrão dos grãos de pólen das pornuças, pode-se observar uma maior variação nos tamanhos. Apesar de todos os acessos apresentarem valores do diâmetro médio acima de 100  $\mu\text{m}$  para os grãos de pólen viáveis, com valores para diâmetro vertical de 107,53  $\mu\text{m}$  a 116,06  $\mu\text{m}$  e para horizontal de 107,74  $\mu\text{m}$  a 118,05  $\mu\text{m}$ , o desvio padrão apresentou valores mais elevados, variando de 14,55  $\mu\text{m}$  a 19,54  $\mu\text{m}$  na vertical, e de 14,94  $\mu\text{m}$  a 18,85  $\mu\text{m}$  na horizontal.



**Figura 3.** Grãos de pólen corados com carmim acético de quatro acessos de pornunça cultivadas no Vale do São Francisco. Coloração mais intensa e maior diâmetro indicam grãos de pólen viáveis, enquanto que coloração clara e menor diâmetro estão relacionados a grãos de pólen inviáveis. Valores das medições estão em micrômetros.

Os grãos de pólen inviáveis de pornunça obtiveram valores do diâmetro médio muito menores que os da maniçoba, variando de 36,17  $\mu\text{m}$  a 43,04  $\mu\text{m}$  (vertical) e 35,75  $\mu\text{m}$  a 43,71  $\mu\text{m}$  (horizontal). Diferenças de tamanhos tanto para grãos de pólen viáveis como para inviáveis podem ser observadas na Figura 3, demonstrando a grande desuniformidade de tamanhos dos grãos de pólen em todos os acessos de pornunça. Essa variação de tamanhos de grãos de pólen pode estar relacionada ao menor percentual de viabilidade polínica obtido para esse genótipo, sendo ainda um indicativo de possíveis anormalidades meióticas resultantes de um processo de hibridação interespecífica. Neste caso é necessária a análise meiótica para confirmação.

Por fim, a contribuição dos gametas masculino e feminino resulta na manifestação do genótipo de um indivíduo. Nesse caso, quanto maior for a viabilidade polínica, maior será a possibilidade da formação de diferentes combinações entre os alelos, e, conseqüentemente, em formação de maior variabilidade genética. Contudo, isso se aplica apenas para espécies alógamas, onde cada gameta carrega consigo a informação genética conseqüente da heterozigose, possibilitando assim, diferentes combinações entre os alelos. Neste intuito o conhecimento da viabilidade polínica é um fator de extrema importância para o melhoramento de plantas, em especial da mandioca, no que diz respeito à utilização de acessos silvestres como possíveis fontes de variabilidade.

## **Conclusões**

Todos os acessos de *Manihot* analisados apresentam  $2n=36$ . A coloração diferencial CMA/DAPI revela a presença de seis a oito cromossomos com porção subterminal distendida, possivelmente relacionada à região

organizadora dos satélites para a mandioca e maniçoba, e de seis a doze para a pornunça.

Os acessos de maniçoba e de pornunça tiveram viabilidade polínica alta, podendo ser recomendadas como genótipos doadores de pólen em trabalhos de pesquisa com melhoramento genético. Entretanto, enquanto o diâmetro dos grãos de pólen da maniçoba não teve variação, os de pornunça são bastante variáveis, sendo um indicativo de possíveis anormalidades meióticas devidas a hibridações interespecanteriores.

## Referências

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihote sculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 159-168, 2002.

CARVALHO, R.; GUERRA, M.; CARVALHO, P. C. L. Occurrence of Spontaneous Triploidy in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia**, v. 64, n. 2, p. 137-140, 1999.

CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 13, p. 276–282, 2005.

CRUZ, N. D. Citologia no gênero *Manihot* Adans. I. Determinação do número de cromossomos em algumas espécies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 40, n. 1, p. 91-95, 1968.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in Citrus species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v. 71, p. 234–241, 1993.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo, editora FUNPEC, 2002, 131 p.

HASHIMOTO-FREITAS, D. Y.; NASSAR, N. M. A. Cytogenetic and anatomic behavior of cytochimeras and total polyploids in cassava. **Genetics and Molecular Research**, v. 12 n. 4, p. 4879-4894, set. 2013.

HISTER, C. A. L.; TEDESCO, S. B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 135-141, out. 2016.

JENNINGS, D. L. Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava and the effect of interspecific crossing on fertility. **Euphytica**, v. 12, n. 1, p. 69-76, abr. 1963.

JENNINGS, D.L. Cassava. In: Evolution of crop plants (ed. NW Simonds). **Longman**, Harlow, p. 81–84, 1976.

MAGOON, M. L.; KRISHNAN, R.; VIJAYA BAI, K. Morphology of the Pachytene Chromosomes and Meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia**, v. 34, n. 4, p. 612-626, 1969.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER FILHO, P.E.; BARTH, O.M. & REINERT, F. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica** v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

NASSAR, H. N.; NASSAR, N. M. A.; VIEIRA, C.; SARAIVA, L. S. Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and its backcross progeny. **Canadian Journal of Plant SCIENCE**, Quebec, Canadá, v. 75, p. 675–678, 1995.

NASSAR, N. M. A. Chromosome number and meiotic behaviour of some wild *Manihot* species native to Central Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 1, n. 1, dez. 1977.

NASSAR, N. M. A.; HASHIMOTO, D. Y.; RIBEIRO, D. G. Genetic, embryonic and anatomical study of an interspecific cassava hybrid. **Genetics and Molecular Research**, v. 9 n. 1, p. 532-538, jan. 2010.

ORLANDINI, P.; LIMA, L. R. Sinopse do gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 51-60, 2014.

SARDOS, J.; RODIER-GOUD, M.; DAMBIER, D.; MALAPA, R.; NOYER, J. L.; LEBOT, V. Evidence for spontaneous polyploidization in cassava *Manihot esculenta* Crantz. **Plant Systematics and Evolution**, v. 283, p. 203-209, 2009.

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

VIEIRA, L. J.; SOARES, T. L.; ROSSI, M. L.; ALVES, A. A. C.; SANTOS, F. A. R.; SOUZA, F. V. D. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 350-356, 2012.

WILLIAMS, E. G.; ROUSE, J. L. Relationships of pollen size, pistil length and pollen tube growth rates in *Rhododendron* and their influence on hybridization. **Sexual Plant Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 7-17, fev. 1990.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização citogenética e molecular é essencial para o armazenamento de informações genéticas importantes para o melhoramento. A utilização de marcadores moleculares ISSR é bastante eficiente, apresentando alto grau de polimorfismo. Através da caracterização citogenética foi possível observar o número de cromossomos de alguns acessos do gênero *Manihot*. Foi analisada também a viabilidade polínica, constatando-se uma grande variação de tamanho e número de grãos de pólen inviáveis para a polinização. No entanto, ainda são necessários outros estudos mais aprofundados sobre espécies de *Manihot*, principalmente as silvestres que armazenam uma riqueza de dados a serem explorados.