



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM BIOLOGIA

THAMYRES CARDOSO DA SILVEIRA

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES
SILVESTRES DE *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) E SEU USO
PARA A TAXONOMIA DA SEÇÃO *Quinquelobae***

Cruz das Almas
2012

THAMYRES CARDOSO DA SILVEIRA

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES
SILVESTRES DE *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) E SEU USO
PARA A TAXONOMIA DA SEÇÃO *Quinquelobae***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC),
apresentado ao curso de graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Recôncavo da Bahia, como requisito para
obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha
Moreira

Co-orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

Cruz das Almas – BA

2012

THAMYRES CARDOSO DA SILVEIRA

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES
SILVESTRES DE *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) E SEU USO PARA A
TAXONOMIA DA SEÇÃO *Quinquelobae***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), apresentada como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aprovada em 15 de fevereiro de 2012.

Banca Examinadora

Cláudia Fortes Ferreira – Co-orientadora
Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Paulo Cezar Lemos de Carvalho
Professor Adjunto IV da UFRB

Lidyanne Yuriko Saleme Aona-Pinheiro
Professora Adjunto II da UFRB

"Assim como a semente traça a forma e o destino da árvore, os teus próprios
desejos é que te configuram a vida."

Emmanuel (psicografado por Chico Xavier)

DEDICO

À minha família, em especial minha mãe pelo amor dedicado e pelo incentivo para superação das adversidades.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, por me fazer uma guerreira sempre em busca de meus ideais, proporcionando-me mais uma conquista;

À minha família que sempre acreditou em mim, oferecendo apoio e força para meu crescimento profissional, em especial minha mãe que sempre sonhou o mesmo sonho. Amo vocês!

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela minha formação profissional;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela concessão do espaço e recursos financeiros para execução do trabalho;

Ao professor Márcio, pelas grandes contribuições em meus trabalhos. Aprendi muito com você. À minha orientadora Dra. Cláudia Fortes pela colaboração, ensinamentos, disponibilidade e paciência. A Dra. Fernanda Vidigal e Dr. Antônio Souza pelo conhecimento compartilhado.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular, por todo conhecimento transmitido, Epaminondas, Raimundo e Fernanda;

Aos colegas da Embrapa pela disponibilidade em me ajudar: Lívia Vieira, Ariana Santos, Maiane Suzarte, Jacqueline Araújo, Gilmara Alvarenga, Rafaella Lima, Rangeline Azevedo, e Franciele Nunes.

A Johnny pela incansável ajuda e pelo amor doado.

Aos amigos, que sentirei muita saudade: Carina de Oliveira, Gabriela Carneiro, Larissa Santos, Reizaluamar Neves, Alexsandro Anjos, Amor Divino, Pupu... vocês sempre me presentearam com muita alegria.

A todos que de alguma forma tornou possível à concretização desse sonho.

Meu muito obrigada a todos.

RESUMO

Estudo da variabilidade genética de espécies silvestres de *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) e seu uso para a taxonomia da seção *Quinquelobae*

Esse trabalho teve por objetivo caracterizar acessos da coleção de espécies silvestres de *Manihot* Mill. da Embrapa Mandioca e Fruticultura por meio de descritores morfológicos e marcadores de DNA do tipo microssatélites visando o estudo de diversidade genética e taxonomia. A análise molecular envolveu 87 acessos. O agrupamento pelo método UPGMA permitiu a formação de dois grandes grupos. O primeiro reuniu parentes silvestres da mandioca (*M. esculenta* Crantz ssp. *flabellifolia* (Pohl) Cifferi e *M. esculenta* Crantz ssp. *peruviana* (Mueller) Allem), *M. compositifolia* Allem e um acesso não identificado (FRF). O segundo grupo englobou os demais acessos e dividiu-se em dois grandes subgrupos. O primeiro formado por espécies de hábito arbustivo, em sua grande maioria, do cerrado e campo rupestre e apenas uma espécie da caatinga e o segundo formado por espécies de porte arbóreo e, em maioria, endêmicas da Caatinga do Nordeste do Brasil. Na caracterização dos acessos para taxonomia da seção *Quinquelobae*, os microssatélites delimitaram grupos de espécies com forte correspondência biogeográfica em todas as três análises, sendo que o coeficiente de correlação cofenético foi mais alto (0,92**) na análise que considerou os dados quantitativos, categóricos e moleculares simultaneamente, através do método Ward-MLM.

Palavras-chave: Diversidade. Filogenia. Análise de agrupamento. Microssatélites

ABSTRACT

Genetic variability of wild species of *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) and its use in taxonomy studies of the *Quinquelobae* section

The objective of the present study was to characterize accessions of the wild species collection of *Manihot* at Embrapa Mandioca e Fruticultura using morphologic and SSR DNA markers to study the genetic diversity and taxonomy. The molecular analysis was carried out using 87 accessions. Cluster by the UPGMA method allowed the formation of two groups. The first comprised wild relatives of cassava (*M. esculenta* Crantz ssp. *flabellifolia* (Pohl) Cifferi e *M. esculenta* Crantz ssp. *peruviana* (Mueller) Allem), *M. compositifolia* Allem and one non-identified accession (FRF). The second group comprised the other accessions and was subdivided into two other groups. The first made up by species habit shrubby, mostly, from the cerrado region and rocky fields and a caatinga specie and the second formed by arboreal species, and mainly, from the caatinga and from the Northeast Region of Brazil. For the characterization of the accessions for the taxonomic study of the *Quinquelobae* species, microsatellites were able to separate species with strong biogeographic correspondence in all three analysis, where as the cophenetic correlation was very high (0.92**) for the analysis of the quantitative, categoric and molecular data simultaneously, using the Ward-MLM algorithm.

Key-words: Diversity. Phylogeny. Cluster analysis. Microsatellites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Padrão de amplificação do Iniciador SSRY 12. M: Marcador de peso molecular 50 pb (Bio Labs), amostras 1 a 40 acessos de acordo com a ordem da Tabela 1 30

Figura 2: Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética entre 87 acessos de espécies silvestres de *Manihot*, utilizando um total de 83 alelos a partir de marcadores SSR. 34

Figura 3. Dendrograma obtido pelo método Ward-MLM, a partir da matriz de dissimilaridade genética entre 30 acessos de *Manihot*, utilizando 30 descritores morfológicos. 44

Figura 4. Dendrograma obtido pelo método Ward-MLM, a partir da matriz de dissimilaridade genética entre 30 acessos de *Manihot*, utilizando um total de 57 alelos acessado por marcadores SSR. 45

Figura 5: Dendrograma obtido pelo método Ward-MLM, a partir da matriz de dissimilaridade genética entre 30 acessos de *Manihot*, utilizando dados morfológicos, categóricos e de marcadores SSR simultaneamente. 46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Acessos de *Manihot* pertencentes à coleção de espécies silvestres de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, utilizados no estudo. Cruz das Almas, 2012. 26
- Tabela 2:** Condições de reação e amplificação dos Iniciadores de SSR 29
- Tabela 3:** Iniciadores microssatélites, sequência repetida, número de alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Cruz das Almas, 2012 31
- Tabela 4:** Espécies de *Manihot*, código dos acessos e habitat dos 30 acessos de espécies silvestres de *Manihot* utilizados. Cruz das Almas, 2012. 38
- Tabela 5:** Descritores morfológicos utilizados para caracterização dos 52 acessos de espécies silvestres de *Manihot* utilizados. Cruz das Almas, 2011. 38
- Tabela 6:** Iniciadores microssatélites, sequência repetida, número de alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Cruz das Almas, 2012. 41
- Tabela 7:** Reagentes para preparo do Mix 2 para PCR. 58
- Tabela 8:** Reagentes para preparo do Mix 5 para PCR 58

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 14 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 4. OBJETIVOS..... | 22 |
| 5. CAPÍTULO I: | 24 |
| 5.1.INTRODUÇÃO..... | 24 |
| 5.2.MATERIAIS E MÉTODOS..... | 25 |
| 5.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 29 |
| 5.4.CONCLUSÕES..... | 35 |
| 6. CAPÍTULO II: | 36 |
| 6.1.INTRODUÇÃO..... | 36 |
| 6.2.MATERIAIS E MÉTODOS..... | 37 |
| 6.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 41 |
| 6.4.CONCLUSÕES..... | 47 |
| REFERÊNCIAS..... | 48 |
| ANEXO 1..... | 56 |
| ANEXO 2..... | 58 |

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Manihot* é dividido em 19 seções, sendo 16 delas sul americanas (Rogers e Appan, 1973). A seção *Quinquelobae* é a segunda maior do gênero, com espécies que apresentam como principais características, inflorescências racemosas e folhas 3 a 5 lobadas, discolores, com face abaxial glauca e tonalidades vináceas nos pecíolos e nervuras. Rogers e Appan (1973) consideram 14 espécies para a seção *Quinquelobae*. Entretanto, Allem (1984) em uma revisão dessa seção, altera a circunscrição de *Manihot violacea*, reduzindo o número de espécies para dez.

Considerado o centro de maior diversidade do gênero *Manihot*, o Brasil abriga cerca de 80% do total das espécies conhecidas. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) se destaca dentro do gênero devido sua importância econômica e social, constituindo a base alimentar de cerca de 700 milhões de pessoas no mundo e é cultivada em praticamente todas as regiões do Brasil.

Espécies silvestres de *Manihot* são importantes reservatórios de alelos de interesse a serem transferidos para a espécie cultivada visando o desenvolvimento de variedades melhoradas que sejam mais resistentes a fatores bióticos e abióticos e que expressem maior produtividade (Nassar, 2006).

A variabilidade genética, intra e inter-específica, representativa dos recursos genéticos vegetais, é em grande parte manejada e estabelecida nos bancos de germoplasma, os quais podem ser compostos por parentes silvestres da espécie, cultivares locais (*landraces*), linhagens melhoradas e cultivares atuais (Valls, 2007).

A principal finalidade de bancos de germoplasma é conservar a diversidade genética. Porém, para melhor aproveitamento dessa diversidade, são essenciais atividades de caracterização e avaliação, que quando conduzidas corretamente, permitem: a identificação de acessos duplicados, evitando a duplicação de atividades e reduzindo o desperdício de tempo e de recursos financeiros. Permite também o estabelecimento de coleções nucleares, que consiste de um grupo de acessos selecionados para representar a diversidade genética de uma coleção com um mínimo de redundância e a identificação dos modos de reprodução que predomina nos acessos (Van Sloten, 1987; Valls, 2007), facilitando em grande parte a rotina de trabalho dos melhoristas.

Para se fazer a caracterização, pode-se utilizar um método específico ou o conjunto de métodos, sendo eles: morfológico, bioquímico, citológico e molecular

(Pereira e Pereira, 2006). Segundo Ferreira (2006), os métodos morfológico e molecular são os mais utilizados para caracterizar acessos de um banco de germoplasma.

O uso de descritores morfológicos na caracterização é considerado um dos primeiros métodos para se conhecer a variabilidade presente em uma coleção ou banco de germoplasma. Esses descritores são baseados no fenótipo e o método é considerado de custo reduzido e de fácil aferição. Entretanto, o fenótipo sofre influência ambiental, principalmente se o descritor for quantitativo, apresentando baixa herdabilidade. Esse é um dos fatores que restringe o conhecimento mais preciso da variabilidade. Entretanto, o uso de descritores adequados, que apresentem alta herdabilidade conduzirá a uma caracterização mais robusta.

Os marcadores de DNA são importantes ferramentas para a quantificação da variabilidade disponível por detectarem variações no genoma, representando eficiência e qualidade na caracterização e sendo isentos de influência ambiental. Contudo, as limitações no uso desses marcadores vão desde o custo para a obtenção desses materiais até a necessidade de especialistas para o desenvolvimento do trabalho.

Um dos problemas encontrados pelos curadores de coleções de germoplasma é a identificação dos acessos, especialmente quando eles representam espécies próximas ou relacionadas (Borém e Caixeta, 2009). A classificação botânica, muitas vezes, não é um processo fácil, considerando a alta variabilidade intra-específica e o efeito ambiental sobre o fenótipo diferenciador entre espécies e variedades botânicas dentro de espécies (Faleiro, 2007). Os marcadores moleculares são úteis nessa tarefa, já que a análise é feita em nível de genoma, onde o DNA não sofre influência ambiental.

Os estudos de relações filogenéticas e de divergência genética têm sido uma das contribuições mais concretas dos marcadores moleculares para a organização e uso nos programas de melhoramento genético. Dentre os marcadores de DNA, os microssatélites, ou também como são conhecidos, SSR – *Simple Sequence Repeats* são muito usados.

Esses marcadores são os preferidos pelos melhoristas pela sua natureza co-dominante, por serem altamente polimórficos, estáveis e apresentarem alta reprodutibilidade (Gaudeul *et al.*, 2004). De acordo com Nienhius *et al.* (1994), os marcadores moleculares apresentam as seguintes características: a) podem ser

obtidos de quaisquer tecido/órgão da planta; b) não são afetados pelo ambiente; c) o número de marcadores é praticamente ilimitado; e d) podem ser utilizados, dentre outros estudos, na construção de mapas genéticos, estudos de diversidade genética e filogenia.

Para estimar o grau de semelhança entre acessos é necessário considerar medidas que descrevem a dissimilaridade ou similaridade entre esses elementos amostrais, de acordo com as características que neles foram mensuradas (Karia, 2008). A estimativa da diversidade genética normalmente é realizada considerando, de forma individualizada, dados quantitativos e qualitativos (Cabral *et al.*, 2010). Contudo, quando se tem variáveis quantitativas, multicategóricas e moleculares simultaneamente, um dos métodos indicados é o algoritmo de Gower, que permite agrupar os indivíduos analisando concomitantemente todos os tipos de variáveis com base em métodos de agrupamento tais como UPGMA e Ward-MLM (*Modified Location Model*) (Brandão, 2011; Pereira, 2011).

Esse trabalho teve por objetivo realizar a caracterização de acessos da coleção de espécies silvestres de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura por meio de descritores morfológicos e moleculares e posterior agrupamento para definição da diversidade genética entre os acessos e inferências taxonômicas.

2. JUSTIFICATIVA

As pesquisas desenvolvidas com a cultura da mandioca contemplam essencialmente aspectos agrônômicos e de melhoramento. Um grande problema é a falta de estudos das espécies silvestres do gênero *Manihot*. Essas espécies possuem um reservatório de alelos interessantes que podem ser resgatados na obtenção de novas variedades de mandioca mais resistentes a doenças, mais nutritivas e mais produtivas. Esta proposta dará um grande suporte ao programa de melhoramento de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no sentido de conhecer a diversidade e identificar a proximidade genética entre as espécies da coleção, visando estabelecer hibridações controladas para conduzir ao desenvolvimento de novas variedades.

Com a utilização de espécies silvestres, o projeto visa um impacto ambiental positivo tendo em vista a representativa variabilidade a ser resguardada na coleção de espécies que apresentam elevado risco de erosão genética.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Taxonomia, distribuição geográfica e importância econômica

O gênero *Manihot* Miller pertence à família Euphorbiaceae, a qual é composta por 307 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies apresentando distribuição mundial com grande diversidade nos trópicos (Judd *et al.*, 1999). No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies espalhadas em todos os tipos de vegetação (Cordeiro, 1992). Pertencente à subfamília Crotonoideae, *Manihot* Miller encontra-se na tribo Manihoteae.

A primeira citação de *Manihot* ocorreu por volta de 1651, por Bauhin. Porém, o gênero *Manihot* foi descrito por Miller (1754) na 4ª edição do Gardener's Dictionary, designando *Manihot theveti* como espécie tipo. Até a publicação válida do trabalho de Miller ser reconhecida, Adanson (1763) era considerado autor do gênero (Rodrigues, 2007).

A primeira monografia sobre o gênero *Manihot* foi publicada por Pohl (1827), listando 48 espécies. Mueller (1866) publicou a segunda monografia sobre o gênero, estabelecendo 43 espécies para o mesmo. Mueller (1874) descreveu na Flora brasiliensis 72 espécies para o gênero sendo a maioria restrita ao território brasileiro.

O estudo mais completo sobre *Manihot* foi publicado por Pax (1910). O autor reuniu toda a bibliografia, analisou e citou as coleções clássicas. Nesse trabalho foram listadas 128 espécies distribuídas em 11 seções e foi elaborada a chave de identificação para todos os táxons.

A monografia de Rogers e Appan (1973) reduz o número de espécies de 171 para 98 com base em análises multivariadas de 44 caracteres vegetativos observados em herbário, em que características da folha foram significantes (Bertram 1993). As 98 espécies reconhecidas para o gênero *Manihot* ficaram distribuídas em 19 seções, variando desde árvores, na seção *Glaziovianae*, até sub arbustos com caule reduzido na seção *Stipularis* (Carvalho, 2006). Das 19 seções

13 ocorrem no Brasil, sendo que *Manihot esculenta* Crantz pertence à seção *Manihot*.

Os trabalhos de Allem (1978, 1979, 1989b, 1999, 2001) contribuíram muito para o melhor entendimento do gênero, acrescentando diversos táxons ao gênero, citações de novas localidades e novas características para táxons já descritos (Rodrigues 2007).

O gênero atualmente é dividido em 19 seções sendo 16 delas sul americanas (Rogers & Appan, 1973). Estudos recentes baseados em dados moleculares têm apontado diversas incongruências nessa classificação e evidenciado uma grande influência biogeográfica na filogenia do grupo; com espécies da Caatinga e do Cerrado formando grupos distintos e bem sustentados (Chacon *et al.*, 2008; Duputié *et al.*, 2011).

A grande diversidade de espécies de *Manihot* que ocorrem no Brasil reforça a teoria de que a origem e domesticação da mandioca por parte dos ameríndios possa ter acontecido no país. Todas as espécies de *Manihot* são nativas das regiões tropicais do Novo Mundo, especialmente Brasil e México. Nassar (2000) definiu quatro centros de diversidade para essas espécies: México, Nordeste, Centro e Sudeste do Brasil, com microcentros de diversidade no Brasil Central. Segundo esse autor, a formação desses microcentros é devido à frequente hibridação entre espécies e à heterogeneidade da topografia de seus habitats, que ajudam a isolar populações que iniciam a especiação. Espécies arbóreas como *Manihot glaziovii* e *M. pseudoglaziovii* são encontradas no Nordeste do Brasil, enquanto que espécies de pequeno porte são comuns no Brasil Central (Carvalho, 2006).

A maioria das espécies é restrita a ambientes relativamente secos sendo que algumas são tipicamente encontradas em ambientes perturbados em floresta. Determinadas espécies possuem raízes tuberosas que facilita a rebrota após perturbação. O fogo provavelmente foi o mais importante tipo de perturbação da história do gênero (Duputié *et al.*, 2011).

Espécies de *Manihot* parecem ter evoluído carúncula maior em sementes menores, favorecendo o processo de dispersão em que formigas consomem a carúncula e enterram a semente, protegendo-as do fogo e de granívoros (Duputié *et al.*, 2011). A dormência apresentada por sementes de *Manihot* é frequentemente quebrada por temperaturas elevadas no solo (Pujol *et al.*, 2002; Duputié, 2008). Espécies que apresentam frutos indeiscentes têm sementes sem carúncula ou esta

se encontra muito reduzida. A dispersão dessas sementes não é feita por formigas, já que as sementes são grandes demais para serem transportadas por estes insetos.

Além da dispersão, a forma de crescimento também mostra variação dentro do gênero com árvores, arbustos, herbáceas ou videiras; todas sendo representadas (Deputié *et al.*, 2011). A variação ocorre também na forma de folhas, o que contrasta com a morfologia melhor conservada de flores e frutos. Essa característica e a produção freqüente de formas híbridas tornam difícil a diferenciação entre as espécies com base na morfologia (Rogers e Appan, 1973).

O isolamento reprodutivo não parece ter sido completo entre as espécies do gênero, já que ocorrem freqüentes hibridações interespecíficas. Apesar do isolamento reprodutivo nem sempre estar relacionado com o tempo de divergência, (Parks e Wendel, 1990; Moyle *et al.*, 2004) esta observação parece ser consistente haja vista a origem provavelmente recente do gênero (Deputié, 2011).

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, constitui a única espécie cultivada desse gênero, sendo utilizada como base alimentar principalmente como fonte de amido nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.

A mandioca é produzida em todo o território brasileiro, mas a sua maior concentração é na Região Nordeste, cuja participação chega a 40%, destacando-se os estados da Bahia, Maranhão e Ceará. A Bahia representa 50% da produção nordestina, possui um centro de Pesquisa da EMBRAPA em Cruz das Almas, e conta com centenas de “casas de farinha” (Seab, 2007).

No Brasil, o pó de folhas de mandioca vem sendo utilizado como ingrediente de multimisturas ou adicionado à refeição no combate a desnutrição infantil, sendo acrescentadas às merendas escolares ou incluídas em cestas básicas para famílias carentes em várias regiões do país, além de ser um subproduto de ampla disponibilidade e baixo custo (Wobeto *et al.*, 2004; Vieira, 2010).

Outras espécies também desempenham importância em nível econômico. As maniçobas (*M. dichotoma*, *M. caerulenses* e *M. glaziovii*), constituíram, por muito tempo, uma fonte importante de látex, ao lado da seringueira. Esse produto era extraído não apenas por cortes realizados nos caule, como também por sangrias nas raízes. Em algumas regiões do semi-árido nordestino conservam-se e até são realizados plantios de *M. glaziovii*, para ser utilizada como forragem para bovinos, caprinos e ovinos; na forma de silagem ou feno (Carvalho, 2006). Essa espécie é

também utilizada como herbicida e fungicida (Pereira *et al.*, 1999). *Manihot nogueirae*, *M. peltata* e *M. pusilla*, devido sua beleza, podem ser empregadas na ornamentação de jardins rupestres (Rodrigues, 2007).

Manihot dichotoma produz sementes com uma considerável quantidade de reservas nutritivas, que além de servirem como alimento para a fauna silvestre, são quebradas e suas reservas utilizadas para alimentação de porcos, galinhas e pessoas com menor poder aquisitivo, que moram em locais com poucos recursos naturais (Carvalho, 2006).

3.2 Caracterização de germoplasma e diversidade genética

A variabilidade genética, inter e intra-específica, representativa dos recursos genéticos vegetais, é em grande parte manejada e organizada nos bancos de germoplasma, que se constituem em estrutura física, onde as coleções são conservadas na forma de células, tecidos, sementes ou plantas (Nass, 2001). Cada amostra de germoplasma é considerada de acesso.

Características como resistência a fatores bióticos e abióticos, alta capacidade produtiva, adaptação a diversas condições ecológicas, entre outras, são comumente encontrados em acessos presentes em bancos de germoplasma e, portanto, são de grande importância ao melhoramento genético das espécies vegetais. No entanto, é necessária a caracterização desses acessos para que essa variabilidade seja conhecida, podendo-se utilizar um método específico ou a combinação de métodos para a caracterização, sendo eles morfológico, bioquímico, citológico e molecular (Pereira e Pereira, 2006). Segundo Ferreira (2006), os métodos morfológico e molecular são os mais empregados na caracterização de acessos.

A caracterização é uma atividade essencial no manejo de coleções de germoplasma, já que visa à tomada de dados para descrever, identificar e diferenciar acessos dentro de espécies, classes ou categorias, utilizando para isso descritores específicos (Querol, 1988; Vicente *et al.*, 2005).

A demanda pela caracterização de germoplasma no Brasil tende a crescer nos próximos anos, especialmente em decorrência da Lei de Proteção de Cultivares. Além da caracterização de cultivares, os programas de melhoramento que adotarem o uso de descritores serão beneficiados com informações adicionais sobre o nível de

diversidade e constituição genética do germoplasma existente (Costa, 2010). No Brasil, a Lei de Proteção de cultivares, abriu uma nova perspectiva e interesse na proteção e lançamento de materiais genéticos (Milach, 1998). A lei é baseada em características morfológicas utilizando descritores (Bonow *et al.*, 2007).

Os marcadores morfológicos correspondem a base de todo e qualquer estudo realizado com acessos contidos em bancos de germoplasma e contribuem para a descrição detalhada de suas características fenotípicas. Características fenotípicas são utilizadas como marcadores morfológicos desde Mendel, com fenótipos de fácil identificação visual, como cor de pétalas, morfologia foliar, cor e forma de sementes, tipo de fruto, entre outros.

No estudo da diversidade genética por meio de características morfológicas adota-se uma lista de descritores com diferentes escalas de notas ou classes as quais são específicas para cada espécie. Se o descritor tem origem quantitativa, faz-se medidas com valores numéricos (Brandão, 2011).

Várias metodologias têm sido propostas para a caracterização do germoplasma de mandioca. Com isso, foi estabelecida e padronizada para uso na América Latina, uma relação de descritores para caracterização morfológica e agrônômica da mandioca (Fukuda e Guevara, 1998) a qual já está sendo aplicada por curadores de bancos de germoplasma de mandioca.

Na caracterização de várias espécies tem-se utilizado um número excessivo de descritores. Isso decorre devido ao desconhecimento da importância de cada um deles para descrever a diversidade existente. Com isso, o uso de técnicas multivariadas tem-se demonstrado eficiente na descrição e seleção de vários caracteres simultaneamente, resultando em economia de tempo e recursos financeiros (Cruz, 1990). Muitos desses descritores são redundantes por serem correlacionados ou dispensáveis por corresponderem a uma fração desprezível da variação total.

O uso de marcadores moleculares na caracterização de germoplasma vem ganhando importância significativa uma vez que fornece informações sobre a variabilidade genética em nível de DNA, sem influência ambiental (Levi *et al.*, 2000) e proporciona maior rapidez na obtenção dos resultados, podendo ser utilizado um grande número de acessos para análise (Brandão 2011).

Os estudos de relações filogenéticas e de divergência genética têm sido uma das contribuições mais concretas dos marcadores moleculares para a organização e

uso das informações em programas de melhoramento genético. A diversidade genética é a base para a adaptação, evolução e sobrevivência das espécies e indivíduos, especialmente sobre mudanças ambientais e condições de doenças, além de ser base para o melhoramento genético e/ou conservação. Em *Manihot*, a alogamia, heterozigozidade e deiscência abrupta dos frutos, favorecem à alta diversidade genética da espécie (Fukuda, 1996).

Estratégias de conservação para as espécies silvestres de *Manihot* são essenciais tanto para reduzir a erosão genética das espécies quanto para acessar a diversidade presente no gênero.

3.3 Melhoramento, marcadores SSR e análise de agrupamento

Marcador molecular é todo polimorfismo detectado na sequência do DNA, podendo ser uma região expressa ou não do genoma. Os marcadores moleculares podem ser caracterizados como dominantes ou codominantes. Marcadores dominantes não distinguem homozigotos de heterozigotos, ao contrário dos codominantes. Atualmente, os marcadores mais utilizados para o estudo de diversidade e caracterização de germoplasma são os SSR, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Os avanços biotecnológicos, sobretudo o desenvolvimento dos marcadores de DNA, têm possibilitado o estudo e a caracterização da variabilidade genética em diferentes níveis (Oliveira, 2006). Os marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramentas auxiliares indispensáveis nas diferentes etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma até o de desenvolvimento e seleção de plantas melhoradas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Um tipo de marcador molecular que é mais informativo na avaliação de germoplasma de mandioca é o microssatélite (Chavarriaga- Aguirre *et al.*, 1998).

Os marcadores microssatélites ou SSR são amplamente aplicados em estudos genéticos, inclusive em conservação genética, caracterização de cultivares, melhoramento molecular e testes de paternidade. Essa ampla aplicação deve-se ao fato de que os SSR são codominantes e multialélicos, altamente reprodutíveis, com ampla resolução e são baseados na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR- Polymerase Chain Reaction) (Oliveira *et al.*, 2006).

Os microssatélites podem ser usados, ainda, para diferenciar indivíduos geneticamente próximos e gerar bancos de dados de referência e apoio na proteção de cultivares. Em razão do alto custo, além do trabalho necessário ao seu desenvolvimento (necessidade de sequenciamento), os SSR têm sido identificados para um número limitado de espécies de importância econômica, como soja, arroz, trigo, cana-de-açúcar e milho, e a quantidade de iniciadores SSR disponíveis para essas espécies é bastante variável (Kuleung *et al.*, 2004). Segundo os autores, a possibilidade de transferência de SSR entre espécies próximas tem sido avaliada como uma forma de aplicar esses marcadores para espécies que ainda não dispõem deles.

Há relatos na literatura de altas taxas de transferabilidade de primers SSR entre espécies arbóreas aparentadas: Fabaceae (Dayanadan *et al.*, 1997) e espécies do gênero *Eucalyptus* (Myrtaceae) (Brondani *et al.*, 1998).

Betram (1993) foi o primeiro que usou marcadores moleculares para inferir as relações entre espécies de *Manihot*. O melhoramento da cultura da mandioca tem se desenvolvido em diferentes estágios, tais como avaliação de variedades “landraces” (nativas), coletas e intercâmbio de germoplasma regional e global, recombinação e seleção de clones e uso de espécies silvestres para ampliar a base genética (Fukuda, 2006).

Em diversas culturas, as espécies silvestres vêm sendo utilizadas pelos melhoristas como fonte de caracteres úteis (Nassar, 1986); Bellon *et al.*, 2007). No caso específico da mandioca, espécies silvestres são fundamentais para o trabalho de melhoramento genético por serem importantes reservatórios de alelos de interesse a serem transferidos para a espécie cultivada.

Com o intuito de melhorar a cultura da mandioca, muitos estudos têm sido realizados; seja para determinar a variabilidade genética (Beeching *et al.*, 1993; Fregene *et al.*, 1994; Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 1999; Colombo *et al.*, 2000) ou para identificar os ancestrais da mandioca (Tanksley e McCouch, 1997).

O uso de espécies de *Manihot* silvestres em programas de melhoramento genético é limitado, principalmente por elas não estarem prontamente disponíveis para os melhoristas, ou por não se estabelecerem facilmente fora de seu ambiente natural. Além disso, pouco se conhece sobre os aspectos da biologia reprodutiva, da constituição genômica e da relação filogenética do gênero, a qual tem se mostrado bastante confusa.

Outro atributo que dificulta a transferência de características de interesse para *M. esculenta* a partir de espécies silvestres de *Manihot* é a elevada heterozigotidade no gênero, que leva à produção de populações híbridas que segregam para diferentes características. Um caso clássico do uso de espécies silvestres no melhoramento genético da mandioca foram os trabalhos realizados na Tanzânia, com a utilização de cruzamento de *M. esculenta* e *M. glaziovii* seguido de três retrocruzamentos, com o objetivo de se incorporar resistência ao mosaico africano (ACMV: African Vassava Mosaic Vírus). Após a obtenção dos híbridos promissores, amostras de sementes foram distribuídas para vários países da África, e na Estação Experimental “*Moor Plantation*”, em Ibadan na Nigéria, o clone 58308 se mostrou resistente (Ekandem, 1970; Jennings, 1972).

Os objetivos de um programa de melhoramento genético com a mandioca são estabelecidos em função das demandas de produção, processamento e mercado e são específicos para cada região. Apesar de se observar que muitos são comuns, principalmente no que se refere ao incremento da produtividade de raízes e à resistência a pragas e doenças. No entanto, os objetivos devem ser dinâmicos e ajustados à evolução do cultivo, dentro de um contexto que envolve a expansão da área cultivada, à diversificação do produto final e às oportunidades de mercados alternativos (Fukuda, 1994).

O uso de técnicas multivariadas é um dos fatores que tem impulsionado o aumento nos estudos sobre divergência genética entre acessos de um banco de germoplasma. Estas são baseadas em algoritmos ou medidas de distância que consideram simultaneamente inúmeras características selecionadas nos experimentos de caracterização e avaliação de germoplasma (Vilela *et al.*, 2008). A análise de agrupamento tem por objetivo proporcionar uma ou várias partições na massa de dados, em grupos, por algum critério de classificação, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (Sneath e Sokal, 1973; Mardia *et al.*, 1997).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica e molecular de espécies do gênero *Manihot*, com o intuito de avaliar a variabilidade genética

disponível para ser explorada dentro do programa de melhoramento genético de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura e estabelecer inferências taxonômicas entre os acessos avaliados.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar por meio de descritores morfológicos acessos de espécies silvestres de *Manihot*,
- Caracterizar por meio de marcadores SSR, espécies silvestres de *Manihot*,
- Estabelecer inferências taxonômicas entre os acessos do gênero *Manihot* estudados.

5. CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS SILVESTRES DE *Manihot* spp. E INFERÊNCIAS TAXONÔMICAS COM USO DE MARCADORES SSR

5.1 Introdução

O gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) é representado por 98 espécies distribuídas desde o Arizona (USA) até a Argentina, sendo a região Neotropical, mais especificadamente o Brasil, o maior centro de diversidade do grupo com cerca de 80% das espécies; o que representa uma ampla variabilidade genética de interesse para uso em programas de melhoramento da mandioca (Rogers & Appan, 1973).

A caracterização dos acessos possibilita a identificação das potencialidades e aptidões de cada um, permitindo que os melhoristas possam selecionar aqueles que atendam às necessidades dos programas de melhoramento da cultura a partir do conhecimento da diversidade entre os genótipos (Araújo *et al.*, 2002).

Um dos problemas encontrados pelos curadores de coleções de germoplasma é a identificação dos acessos, especialmente quando eles representam espécies próximas ou relacionadas (Borém e Caixeta, 2009). A classificação botânica, muitas vezes, não é um processo fácil, considerando a alta variabilidade intra-específica e o efeito ambiental sobre o fenótipo diferenciador entre espécies e variedades botânicas dentro de espécies (Faleiro, 2007). Assim, várias pesquisas (Costa *et al.*, 2006; Pádua, 2004) vêm sendo realizadas utilizando os marcadores moleculares para esse fim.

Marcadores moleculares têm grande potencial como ferramenta auxiliar em trabalhos de classificação botânica e em estudos de filogenia, considerando o poder de diferenciação inter e intra-específico (Cabral *et al.*, 2000; Nicolosi *et al.*, 2000; Raina *et al.*, 2001; Faleiro *et al.*, 2003b, 2003c); entretanto, vale a pena ressaltar que os marcadores moleculares servem para complementar os estudos provenientes da área da botânica (Faleiro, 2007).

Os marcadores microssatélites ou SSR tem sido extensivamente utilizados para a caracterização de espécies devido sua natureza codominante, por serem de fácil reprodução e interpretação de dados (Creste *et al.*, 2003) e constituírem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis hoje. Este

marcador tem sido utilizado com sucesso em pesquisas relacionadas às análises de diversidade genética de diversas culturas como soja (Mulato, 2009), café (Missio *et al.*, 2011), cebola (Santos *et al.*, 2010) e bananeira (Amorim *et al.*, 2008), entre outras.

Vários trabalhos têm mostrado que alguns marcadores microssatélites desenvolvidos para uma espécie pode ser utilizado com sucesso em outra (Hu *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2003; Cordeiro *et al.*, 2001). A transferência de marcadores microssatélites para espécies diferentes faz com que eles tenham grande potencial no mapeamento comparativo e na clonagem de genes interespecíficos (Borém e Caixeta, 2009).

Para o sucesso de um programa de melhoramento, a existência de variabilidade genética para os caracteres de interesse é fundamental. Desta forma, a caracterização por meio do uso de marcadores de DNA torna-se uma excelente ferramenta para que o melhorista possa quantificar a variabilidade disponível entre os acessos.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui uma coleção de espécies silvestres do gênero *Manihot* com aproximadamente 600 acessos. A utilização dos marcadores SSR para caracterização de acessos desse gênero permitirá a obtenção de informações valiosas a respeito da identificação dos acessos da coleção, bem como a classificação daqueles ainda não identificados botanicamente, reclassificação de alguns acessos erroneamente identificados e, ainda, possibilitará o conhecimento do relacionamento em nível molecular entre os diversos acessos avaliados, podendo assim, o melhorista manejar e conservar os recursos genéticos para uso nos programas de melhoramento da cultura da mandioca.

Sendo assim, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a diversidade genética presente em 87 acessos que fazem parte da coleção de espécies silvestres de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura e fazer inferências taxonômicas por meio de marcadores moleculares SSR.

5.2 Material e Métodos

Os 87 acessos de *Manihot* escolhidos para presente trabalho são parte da coleção de espécies silvestres de *Manihot* mantida na Embrapa Mandioca e Fruticultura (Tabela 1).

5.2.1 Coleta das amostras e extração do DNA

O DNA total foi extraído de folhas jovens dos 87 acessos utilizando-se o método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987), com modificações, conforme anexo 1. A avaliação da quantidade e da qualidade do DNA foi realizada pela análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, e as amostras diluídas em água ultrapura e padronizadas para uma concentração final de 2,5 ng μ L.

Tabela 1: Acessos de *Manihot* pertencentes à coleção de espécies silvestres de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, utilizados no estudo. Cruz das Almas, 2012.

| Amostra | Código de campo | Espécie |
|---------|-----------------|-------------------------------|
| 1 | IRW A 027-12 | <i>Manihot irwinii</i> |
| 2 | IRW A 027-3 | <i>Manihot irwinii</i> |
| 3 | IRW A 027-7 | <i>Manihot irwinii</i> |
| 4 | IRW A 027-16 | <i>Manihot irwinii</i> |
| 5 | IRW A 027-20 | <i>Manihot irwinii</i> |
| 6 | TOM 001-42 | <i>Manihot tomentosa</i> |
| 7 | TOM 001-06 | <i>Manihot tomentosa</i> |
| 8 | TOM001-23 | <i>Manihot tomentosa</i> |
| 9 | TOM A 003-05 | <i>Manihot tomentosa</i> |
| 10 | TOM 001-11 | <i>Manihot tomentosa</i> |
| 11 | COM DF 07 | <i>Manihot</i> sp. |
| 12 | COM DF 09 | <i>Manihot</i> sp. |
| 13 | COM DF-01 | <i>Manihot</i> sp. |
| 14 | COMDF-02 | <i>Manihot</i> sp. |
| 15 | COMDF-03 | <i>Manihot</i> sp. |
| 16 | DIC-587 | <i>Manihot dichotoma</i> |
| 17 | DIC-472 | <i>Manihot dichotoma</i> |
| 18 | DIC-00103 | <i>Manihot dichotoma</i> |
| 19 | DIC-008 | <i>Manihot dichotoma</i> |
| 20 | DIC-002 | <i>Manihot dichotoma</i> |
| 21 | DIC 602-04 | <i>Manihot dichotoma</i> |
| 22 | DIC-001 | <i>Manihot dichotoma</i> |
| 23 | MARACA- 01 | <i>Manihot</i> sp. |
| 24 | CEC 019-13 | <i>Manihot cecropiaefolia</i> |
| 25 | CEC 019-25 | <i>Manihot cecropiaefolia</i> |
| 26 | CEC 019-31 | <i>Manihot cecropiaefolia</i> |
| 27 | CEC 019-35 | <i>Manihot cecropiaefolia</i> |
| 28 | FRF 1522 | <i>Manihot</i> sp. |

Tabela 1. Continuação.

| | | |
|----|--------------------|------------------------------|
| 29 | FRF 1522-01 | <i>Manihot sp.</i> |
| 30 | FRF 1522-01 P7 | <i>Manihot sp.</i> |
| 31 | VIO A 001-10 | <i>Manihot violacea</i> |
| 32 | VIO A 001-14 | <i>Manihot violacea</i> |
| 33 | FLA 001-07 | <i>Manihot flabellifolia</i> |
| 34 | FLA 026V | <i>Manihot flabellifolia</i> |
| 35 | FLA 001-04 | <i>Manihot flabellifolia</i> |
| 36 | FLA 005-06 | <i>Manihot flabellifolia</i> |
| 37 | FLA 005-18 | <i>Manihot flabellifolia</i> |
| 38 | PER 002-01 | <i>Manihot peruviana</i> |
| 39 | PER 002-07 | <i>Manihot peruviana</i> |
| 40 | PER 002-03 | <i>Manihot peruviana</i> |
| 41 | PER 005-01 | <i>Manihot peruviana</i> |
| 42 | PER 005-07 | <i>Manihot peruviana</i> |
| 43 | CAE BM 20 | <i>Manihot caerulescens</i> |
| 44 | CAE BM 07 | <i>Manihot caerulescens</i> |
| 45 | CAE BM 10 | <i>Manihot caerulescens</i> |
| 46 | CAE BM 17 | <i>Manihot caerulescens</i> |
| 47 | CAE BM 23 | <i>Manihot caerulescens</i> |
| 48 | GLA 10 DF | <i>Manihot glaziovii</i> |
| 49 | GLA 03 DF | <i>Manihot glaziovii</i> |
| 50 | GLA 22 DF | <i>Manihot glaziovii</i> |
| 51 | GLA 16 DF | <i>Manihot glaziovii</i> |
| 52 | GLA 11 DF | <i>Manihot glaziovii</i> |
| 53 | GLA 12 DF | <i>Manihot glaziovii</i> |
| 54 | ANO 046V | <i>Manihot anomala</i> |
| 55 | ANO 002-01 | <i>Manihot anomala</i> |
| 56 | ANO 072V | <i>Manihot anomala</i> |
| 57 | ANO 089V | <i>Manihot anomala</i> |
| 58 | MAN 049 | <i>Manihot sp.</i> |
| 59 | MAN 054 | <i>Manihot sp.</i> |
| 60 | MAN 037 | <i>Manihot sp.</i> |
| 61 | MAN 045 | <i>Manihot sp.</i> |
| 62 | POR 001 P8 | <i>Manihot sp.</i> |
| 63 | POR 001 P11 | <i>Manihot sp.</i> |
| 64 | POR 001 P12 | <i>Manihot sp.</i> |
| 65 | POR 002 P7 | <i>Manihot sp.</i> |
| 66 | JAC 004 | <i>Manihot jacobinensis</i> |
| 67 | JAC 02 | <i>Manihot jacobinensis</i> |
| 68 | JAC 01 | <i>Manihot jacobinensis</i> |
| 69 | JAC 05 | <i>Manihot jacobinensis</i> |
| 70 | A4525-01 DF B15 P1 | <i>Manihot sp.</i> |

Tabela 1. Continuação.

| | | |
|----|----------------------|-------------------------------|
| 71 | A4594-01 DF B15 P13 | <i>Manihot</i> sp. |
| 72 | A4590-02 DF B15 P22 | <i>Manihot</i> sp. |
| 73 | W856-02 DF B15 P8 | <i>Manihot</i> sp. |
| 74 | M212-02 DF B15 P17 | <i>Manihot</i> sp. |
| 75 | M146-06 DF B15 P30 | <i>Manihot</i> sp. |
| 76 | CTM04-CNPMF B5 P24 | <i>Manihot</i> sp. |
| 77 | CTM03-CNPMF B5 P23 | <i>Manihot</i> sp. |
| 78 | CTM01-CNPMF B5 P21 | <i>Manihot</i> sp. |
| 79 | LOY06-CNPMF B5 P06 | <i>Manihot</i> sp. |
| 80 | LOY02-CNPMF B5 P02 | <i>Manihot</i> sp. |
| 81 | ANO056V- 01 B9 P32 | <i>Manihot anomala</i> |
| 82 | LOY07 B5 P07 | <i>Manihot</i> sp. |
| 83 | COM DF 11 | <i>Manihot</i> sp. |
| 84 | VELHO LAGO-02 B5 P34 | <i>Manihot</i> sp. |
| 85 | ADE03 B5 P11 | <i>Manihot</i> sp. |
| 86 | ADE01 B5 P10 | <i>Manihot</i> sp. |
| 87 | COMPOSITI | <i>Manihot compositifolia</i> |

5.2.2 Genotipagem via marcadores SSR

As reações de amplificação via PCR foram completadas para o volume final de 15 uL contendo os seguintes reagentes: 10 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM (Mix 2) ou 2,5 mM (Mix 5) de MgCl₂ (Tabela 2), 0,2 mM de dNTP, 0,2 mM de cada iniciador, 1U da *Taq* DNA Polimerase. As amplificações foram conduzidas em termociclador *Applied Biosystems* com o seguinte programa de PCR: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min; 27 ou 30 ciclos a 94 °C por 40s, 60°C por 40s (essa temperatura variou de acordo com a temperatura de anelamento –*T_a* - de cada primer), 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 5min.

Foram utilizados quatorze iniciadores de SSR (Tabela 2). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 3% e coloração com brometo de etídeo, visualizados sob luz UV e fotografado em sistema fotodocumentação (Vilber Lourmat). O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 50 pb (Promega).

Tabela 2: Condições de reação e amplificação dos Iniciadores de SSR.

| Nome do iniciador | Ta* | Mix** | Nome do iniciador | Ta* | Mix** |
|-------------------|-----|-------|-------------------|-----|-------|
| SSRY 12 | 58 | 2 | SSRY 103 | 58 | 5 |
| SSRY 27 | 55 | 2 | SSRY 105 | 60 | 5 |
| EME 59 | 58 | 2 | SSRY 106 | 58 | 2 |
| SSRY 77 | 58 | 5 | SSRY 165 | 58 | 5 |
| SSRY 81 | 55 | 2 | SSRY 170 | 50 | 2 |
| SSRY 82 | 55 | 2 | EME 425 | 55 | 2 |
| SSRY 101 | 58 | 2 | EME 445 | 60 | 2 |

* Ta: Temperatura de anelamento do iniciador; **Vide anexo.

5.2.3 Análise dos dados

Os fragmentos foram genotipados com base no seu tamanho em pares de bases (pb), em comparação com padrão de peso molecular *ladder* 50-pb (New England Biolabs).

As estimativas que caracterizam os locos, como o número de alelos por loco, heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e conteúdo informativo (PIC - *Polymorphic information content*) foram obtidas com o auxílio do programa PowerMarker (Liu e Muse, 2005).

A matriz de distância genética, a estruturação da diversidade genética e o dendrograma foram obtidas pelo programa PowerMarker, com o uso do método UPGMA.

5.3 Resultados e Discussão

O número de alelos obtidos foi 83, com média de 8,3 alelos por iniciador. O maior número de alelos foi identificado nos iniciadores SSRY 12 e SSRY 81 (13 alelos) e o menor número no iniciador SSRY 106 (4 alelos) (Tabela 3).

Dos 14 iniciadores SSR testados, 10 iniciadores (71,42%) detectaram polimorfismo nos acessos avaliados, um iniciador foi monomórfico (EME 445) não sendo incluído na análise, assim como outros três que não apresentaram amplificação para nenhum dos acessos avaliados (Figura 1).

Mühlen *et al.* (2000) estudaram a variabilidade genética de 54 etnovariiedades de mandioca originárias de quatro regiões brasileiras por meio de marcadores

microsatélites e os resultados demonstraram que 97,96% dos iniciadores apresentaram polimorfismo. No presente trabalho foram utilizados em espécies silvestres, iniciadores desenvolvidos para a espécie cultivada, o que pode explicar o fato de alguns iniciadores não ter apresentado amplificação.

Apesar do valor um pouco menor de polimorfismo encontrado nesse trabalho, a transferabilidade dos iniciadores mostraram-se eficazes em espécies silvestres. Segundo Márquez-Lema *et al.*, (2010), a transferabilidade entre espécies aparentadas é possível devido à natureza homóloga da sequência de nucleotídeos das regiões flanqueadoras.

Wanyera *et al.* (1992) usando polimorfismo de 13 locos isoenzimáticos, analisou a variabilidade genética de 20 plantas de *M. glaziovii*, 20 clones de mandioca e 49 clones da árvore de mandioca ("*Tree Cassava*"), coletadas na Nigéria, e encontraram maior diversidade entre as árvores de mandioca, seguido por *M. glaziovii* e menor variabilidade entre os clones de mandioca. Isso indica que espécies silvestres apresentam variabilidade tanto ou mais que a espécie cultivada (Ribeiro *et al.*, 2011).

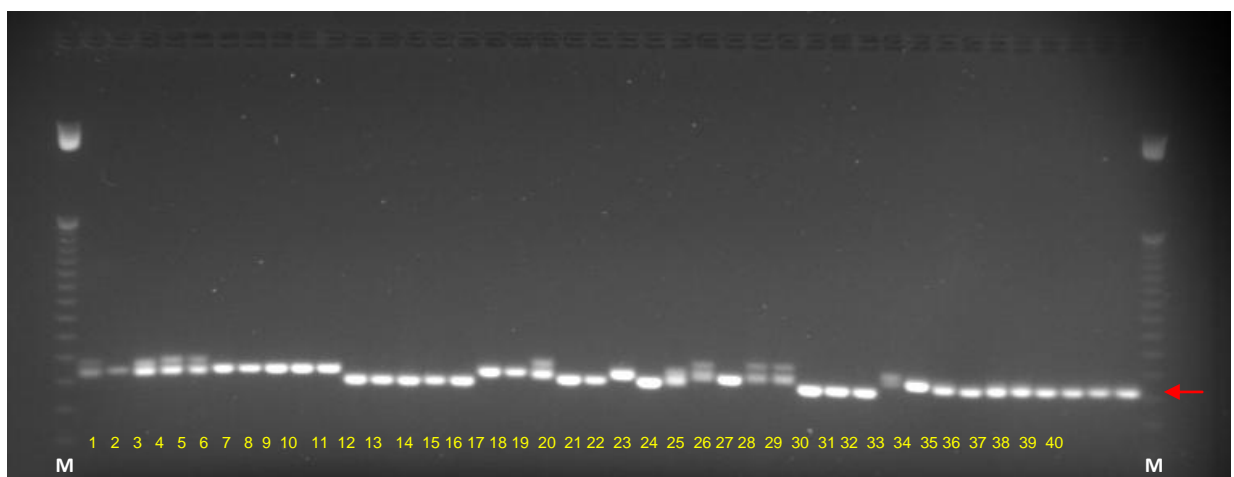


Figura 1: Padrão de amplificação do Iniciador SSRY 12. M: Marcador de peso molecular 50 pb (Bio Labs), amostras 1 a 40, acessos de espécies silvestres de *Manihot* de acordo com a ordem da Tabela 1. Seta vermelha: banda amplificada no gel de agarose 3%.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,48 para o iniciador EME 425 a 0,86 para o iniciador SSRY 12, com média de 0,71.

A correlação entre o número de alelos e o PIC foi alta ($r= 0,898$, $p\leq 0,005$), isso sugere que iniciadores com maior número de alelos apresentam maior capacidade de diferenciação entre os acessos analisados.

Tabela 3. Iniciadores microssatélites, sequência dos primers forward (F) e reverso (R), número de alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Cruz das Almas, 2012.

| Iniciadores SSR | Sequência (F/R) (5' – 3') | Nº de Alelos | PIC |
|-----------------|--|--------------|--------|
| SSRY 12 | aactgtcaaaccattctacttgc/gccagcaaggttgctacat | 13 | 0,8687 |
| SSRY 77 | aggagggtggcagatgtt/gcatgttccacctgcataag | 6 | 0,6036 |
| SSRY 81 | ggcgatttccatgtcatgctt/tgattttctgcgtgatgagc | 13 | 0,8391 |
| SSRY 82 | tgtgacaataaccaccgacagga/cacccatcggcattaaactttg | 8 | 0,8091 |
| SSRY 101 | ggagaataaccaccgacagga/acagcagcaatcaccatttc | 6 | 0,6590 |
| SSRY 103 | tgagaaggaaactgcttgac/cagcaagaccatcaccagttt | 8 | 0,7698 |
| SSRY 105 | caaacatctgcactttggc/tcgagtggcttctgtcttc | 9 | 0,7649 |
| SSRY 106 | ggaaactgctgacaaaga/cagcaagaccatcaccagttt | 4 | 0,4951 |
| SSRY 165 | aatgagttgcaaaggccaa/ggtaacaaatgatgtggtgttc | 11 | 0,8079 |
| EME 425 | Cctccacaaccttatcaatca/cggtagccatagccataaca | 5 | 0,4896 |
| Total | | 83 | 7,1068 |
| Média | | 8,3 | 0,7107 |

A heterozigosidade variou de 0,0698 a 0,3452 para os iniciadores SSRY 106 e SSRY 81, respectivamente. Demonstrando que o iniciador SSRY 81 contribuiu de forma significativa em detectar a variabilidade genética entre os acessos.

O dendrograma das similaridades genéticas baseado em dados SSR, obtido pelo método UPGMA, encontra-se na Figura 2. No agrupamento dos acessos, os subgrupos formados corroboram em boa parte os resultados encontrados na literatura (Chacon *et al.*, 2008; Duputié *et al.*, 2011; Allem, 2002).

O dendrograma apresenta dois grandes grupos. O primeiro, formado por apenas quatro espécies, reúne os parentes silvestres da mandioca (*M. esculenta*) e *M. compositifolia* Allem, espécies comuns em áreas de floresta ombrófila (Allem, 1989; 1994), e um acesso não identificado (FRF). Allem (1989) incluiu *M. compositifolia* na seção *Peruviana* Rogers & Appan, a qual circunscreve plantas caulescentes, trepadeiras de florestas ombrófilas. Esse resultado, no entanto, difere do obtido por Duputié *et al.* (2011), onde *M. compositifolia* aparece próxima das espécies arbóreas de caatinga *M. glaziovii*, *M. dichotoma* e *M. caerulescens*.

Observações de campo relacionadas às características morfológicas supõem que os acessos identificados como FRF sejam prováveis híbridos, e de acordo com os resultados desse trabalho, derivados de alguma das subespécies de *Manihot esculenta*, haja vista sua grande proximidade com acessos dessa espécie.

O segundo grupo engloba os demais acessos e divide-se em dois grandes subgrupos. O subgrupo II engloba espécies de cerrado e campo rupestre, que apresentam brácteas foliáceas ou semifoliáceas, e apenas uma espécie da caatinga (*M. dichotoma*), que possui brácteas setáceas. Dentre as espécies de Cerrado, *M. irwinii*, *M. tomentosa*, *M. cecropiefolia* e *M. violacea*, além do mesmo habitat, compartilham o mesmo hábito, arbustivo, e o tipo de brácteas. Segundo Duputié (2011), as relações filogenéticas entre as espécies de *Manihot* estão diretamente relacionadas à sua distribuição. As duas últimas espécies pertencem à mesma seção dentro do gênero, o que confirma a proximidade encontrada. Contudo, dados oriundos de trabalhos ainda não publicados, têm apontado a possível inclusão de *M. tomentosa* na seção *Quinquelobae*, juntamente com as três espécies citadas.

Acessos de uma espécie provavelmente nova para a ciência, tratada nesse estudo com a sigla de campo COM-DF, ficaram localizados no mesmo grupo das espécies que fazem parte da seção *Quinquelobae*. Esses acessos apresentam características morfológicas que as aproximam das espécies da seção *Quinquelobae*, sobretudo, no tipo de inflorescência racemosa; o que pode explicar seu posicionamento próximo das espécies *M. violacea* e *M. cecropiaefolia*, no presente estudo.

O subgrupo III foi formado por espécies de porte arbóreo e, em maioria, endêmicas da Caatinga do Nordeste do Brasil. Esse subgrupo englobou além de acessos de *M. glaziovii* e *M. caerulescens*, um acesso de *M. anomala* e outros identificados com código de campo CTM, MAN, LOY e A4590-02. Esses outros acessos possuem também hábito arbóreo com frutos e sementes de tamanho médio a grande, quando comparado com outras espécies que fazem parte do gênero. Essas características morfológicas combinadas aos dados oriundos da análise molecular apontam para uma provável relação genética entre os acessos ainda não classificados (CTM, MAN, LOY e A4590-02) e as espécies *M. glaziovii* e *M. caerulescens*.

Dois subgrupos formados por espécies arbóreas ficaram ao lado do grupo irmão composto por acessos de *M. jacobinensis*. A explicação mais congruente com

os resultados é o fato de que a grande maioria desses acessos pertence a espécies que ocorrem em ambiente de Caatinga.

O híbrido pornúncia ficou relacionado com outros acessos de identificação de campo (Velho lago e ADE); ambos considerados prováveis híbridos de *M. esculenta*.

A espécie *M. anomala* foi a que apresentou os acessos mais dispersos em subgrupos diferentes. Morfologicamente, essa espécie possui uma grande plasticidade fenotípica. Contudo, a análise molecular não permite essas conclusões. Sendo assim, outros tipos de estudos em conjunto com a verificação da classificação botânica serão necessários para uma definição mais precisa.

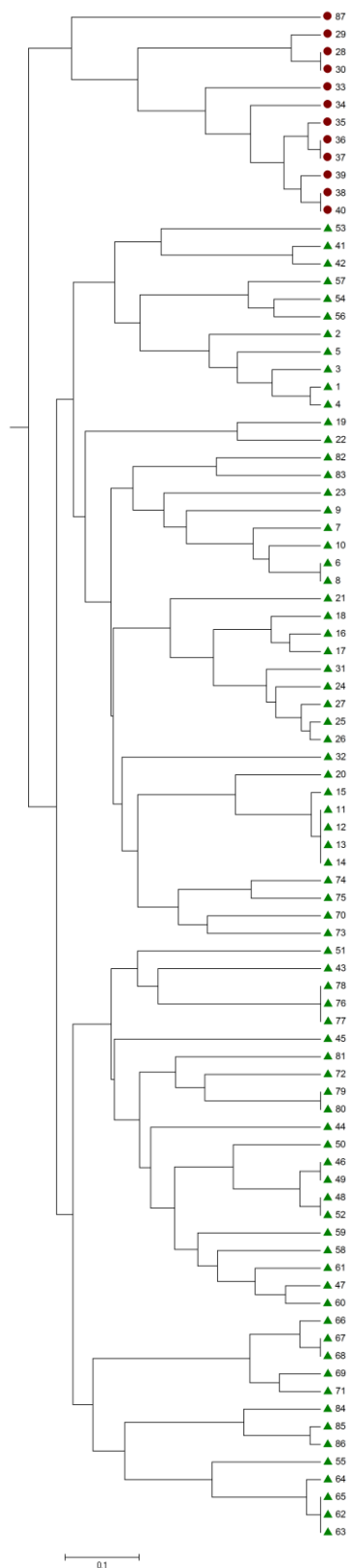


Figura 2. Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade genética entre 87 acessos de espécies silvestres de *Manihot*, utilizando um total de 83 alelos a partir de marcadores SSR. Número das amostras de acordo com a Tabela 1.

5.4 Conclusões

A diversidade presente nos acessos que compõe a coleção de espécies silvestres de *Manihot* poderá ser explorada dentro do programa de melhoramento da mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, visando principalmente à transferência de genes de interesse para a espécie cultivada.

Os pares de *primers* desenhados para a espécie *Manihot esculenta* Crantz são transferíveis dentro do gênero *Manihot*. Esses altos níveis de transferibilidade indicam uma distância genética não muito grande entre as espécies, colaborando com trabalhos que sugerem a origem recente do gênero.

Os resultados encontrados contribuem, sobretudo, no relacionamento das espécies presentes na coleção, mas que ainda não foram classificadas botanicamente, gerando informações que auxiliarão taxonomistas na possível identificação dos acessos.

Mesmo considerando-se as contribuições ao conhecimento atual, o gênero *Manihot* demanda ainda estudos taxonômicos, já que questões relativas à delimitação do gênero ainda não foram satisfatoriamente respondidas.

6. CAPÍTULO II: INFERÊNCIAS TAXONÔMICAS EM ESPÉCIES DA SEÇÃO *Quinquelobae* COM USO DE DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MARCADORES SSR

6.1 Introdução

O gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) é representado por 98 espécies sendo a região Neotropical, mais especificamente o Brasil, o maior centro de diversidade do grupo, com cerca de 80% das espécies (Rogers & Appan, 1973).

O gênero atualmente é dividido em 19 seções; 13 ocorrem no Brasil (Rogers e Appan, 1973). Estudos recentes (Chacon *et al*, 2008; Duputié *et al*, 2011) baseados em dados moleculares, no entanto, têm apontado diversas incongruências nessa classificação e evidenciado uma grande influência biogeográfica na filogenia do grupo, com espécies de caatinga e de cerrado formando grupos distintos e bem sustentados.

A seção *Quinquelobae* é a segunda maior do gênero segundo Rogers e Appan (1973), englobando 14 espécies arbustivas. Allem (1984) admite, no entanto, apenas 10 espécies para essa seção, e altera significativamente a circunscrição de *Manihot violacea* que para o autor inclui também as espécies *M. cecropiaefolia*, *M. divergens* (ambas do cerrado) e *M. jacobinensis* (restrita à caatinga). Para essa análise o autor utilizou dados morfológicos, anatômicos e palinológicos, incluindo ainda um extenso trabalho de campo.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura conta atualmente com cerca de 30 espécies silvestres de *Manihot*, que crescem em campo ou em casas de vegetação. Dentre elas, quatro pertencem à seção *Quinquelobae*. A manutenção dessas espécies visa sua utilização em estudos de melhoramento genético, conservação e taxonomia .

Descritores morfológicos correspondem à base de todo e qualquer estudo realizado com acessos contidos em bancos ou coleções de germoplasma, uma vez que visa a obtenção de dados para descrever, identificar e diferenciar acessos dentro de espécies, classes ou categorias (Vicente *et al.*, 2005).

Os marcadores genético-moleculares permitem gerar grande quantidade de informações sobre a identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos genéticos de determinado grupo ou

táxon, provendo estratégias racionais para o melhoramento, coleta de germoplasma, conservação e utilização de recursos genéticos (Faleiro, 2007).

Segundo Ledo *et al.* (2009) o estudo da diversidade genética quando baseada em dados quantitativos e qualitativos simultaneamente, tem se mostrado mais eficiente do que a análise dos dados separadamente. Essa estratégia de análise individual é questionada, em razão de as distâncias genéticas entre os acessos serem calculadas em função do tipo de variável utilizada, se quantitativa ou qualitativa. A utilização do algoritmo de Gower (1971), na obtenção das estimativas de dissimilaridade, tem-se apresentado como ferramenta útil, pois permite a análise simultânea dessas variáveis.

Para o gênero *Manihot*, informações moleculares são de grande relevância, principalmente agregada a informações morfológicas, ecológicas e anatômicas, proporcionando uma análise mais criteriosa dos resultados e permitindo o esclarecimento das relações filogenéticas entre as espécies.

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica e molecular de 30 acessos do gênero *Manihot*, visando estudar a diversidade e a taxonomia da seção *Quinquelobae*.

6.2 Material e Métodos

A coleção de espécies silvestres de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas, Bahia, conta atualmente com cerca de 30 espécies de *Manihot*, dentre estas, quatro pertencentes à seção *Quinquelobae*: *M. cecropiaefolia* Pohl, *M. irwinii* D.J. Rogers e Appan, *M. jacobinensis* Müll. Arg. e *M. violacea* Pohl. A espécie *M. esculenta* ssp. *flabelifolia* (Pohl) Cifferi foi incluída no estudo como testemunha. *M. tomentosa* Pohl e uma espécie tratada neste estudo com o código de campo *Manihot* COMDF, também foram incluídas por apresentarem similaridades com as espécies da seção *Quinquelobae*; especialmente se tratando das principais características morfológicas definidas para a seção. O número de acessos disponível para cada espécie variou de dois a cinco e ao todo somaram 30. Todas estavam em estágio adulto (Tabela 4).

6.2.1. Análise morfológica

Os descritores morfológicos utilizados seguiram metodologia proposta por Fukuda e Guevara (1998), com ajuste para algumas características específicas das espécies silvestres, como tipo de inflorescência, pilosidade, hábito da planta e posição da inflorescência (Tabela 5).

Tabela 4. Espécies de *Manihot*, código dos acessos e habitat dos 30 acessos de espécies silvestres de *Manihot* utilizados. Cruz das Almas, 2012.

| Espécies | Código | Habitat |
|--|---|---------------------------|
| <i>M. cecropiaefolia</i> Pohl | CEC13; CEC25; CEC1931; CEC1935 | Cerrado |
| <i>M. esculenta</i> ssp. <i>flabellifolia</i> (Pohl) Cifferi | FLA04; FLA026; FLA06; FLA07; FLA18; | Cerrado |
| <i>M. irwinii</i> D.J. Rogers e Appan | IRWA02703; IRWA02707; IRWA02712; IRWA02716; IRWA02720 | Cerrado |
| <i>M. jacobinensis</i> Müll. Arg. | JAC01; JAC02; JAC04; JAC05 | Caatinga e Campo rupestre |
| <i>M. violacea</i> Pohl | VIO10; VIO14 | Cerrado |
| <i>M. tomentosa</i> Pohl | TOM00123; TOM00131; TOM00142; TOMA00305; TOM00106 | Cerrado |
| <i>Manihot</i> COMDF | COMDF01; COMDF02; COMDF03; COMDF07; COMDF09 | Campo rupestre |

Tabela 5. Descritores morfológicos utilizados para caracterização dos 30 acessos de espécies silvestres de *Manihot* utilizados. Cruz das Almas, 2012.

| Descritores Quantitativos: | |
|---------------------------------------|---|
| Altura da planta | Expresso em cm |
| Altura da primeira ramificação | Expresso em cm |
| Comprimento do lóbulo central | Expresso em cm |
| Comprimento do pecíolo | Expresso em cm |
| Largura do lóbulo central | Expresso em cm |
| Níveis de ramificação | |
| Número de hastes | |
| Relação Comprimento/Largura do lóbulo | |
| Retenção foliar | Expresso em % |
| Descritores Qualitativos: | |
| Comprimento da filotaxia | 3= curto; 5= médio; 7=longo |
| Cor da epiderme do caule | 1=creme; 2=marrom claro; 3=marrom escuro; 4=laranja |

Tabela 5. Continuação.

| | |
|--|---|
| Cor da folha apical | 3=verde claro; 5=verde escuro; 7=verde arroxeadado; 9=roxo |
| Cor da folha desenvolvida | 3=verde claro; 5=verde escuro; 7=verde arroxeadado; 9=roxo |
| Cor da nervura | 3=verde; 5=verde com vermelho em < 50%; 7= verde com vermelho em > 50%; 9=toda vermelha |
| Cor do pecíolo | 1=verde-amarelado; 2=verde; 3=verde-avermelhado; 5=vermelho-esverdeado; 7= vermelho; 9= roxo |
| Cor dos ramos terminais em plantas adultas | 3=verde; 5=verde-arroxeadado; 7=roxo 9=alaranjado |
| Cor externa do caule | 3=laranja; 4= verde amarelado; 5=dourado; 6=marrom claro; 7= prateado; 8=cinza; 9=marrom escuro |
| Forma do lóbulo central | 1=ovóide; 2= elíptica-lanceolada; 3=obovada-lanceolada;4=oblonga-lanceolada; 5=lanceolada; 6=reta ou linear;7=pandurada; 8= linear-piramidal; 9=linear-pandurada;10=linear-hostatilobada; 11= obtusa; 12=truncada |
| Hábito da planta | 3=decumbente ; 5=ereta |
| Hábito de crescimento do caule | 1=reto; 2= zig-zag |
| Hábito de ramificação | 1= ereto; 2= dicotômico; 3= tricotômico; 4=tetracotômico |
| Número de lóbulos | 1=três; 3=cinco; 5=sete; 7=nove; 9=onze |
| Pilosidade da planta | 3= sem pilosidade ; 5= pouca; 7= muita |
| Posição da inflorescência | 3= pendente ; 5= ereta |
| Posição do pecíolo | 1=inclinado para cima; 3=horizontal; 5=inclinado para baixo; 7=irregular |
| Pubescência do broto apical | 0=ausente; 1= presente |
| Sinuosidade do lóbulo foliar | 3= liso; 7= sinuoso |
| Tamanho da inflorescência | 3= curta ; 5= média ; 7= longa |
| Tipo de inflorescência | 3=panícula ; 5=racemo |
| Tipo de planta | 1= compacta; 2=aberta; 3= guarda-sol; 4= cilíndrica |

6.2.2 Análise molecular

O DNA total foi extraído de folhas jovens dos 30 acessos com uso do método CTAB descrito por Doyle & Doyle (1990), com modificações, conforme anexo 1. A avaliação da quantidade e da qualidade do DNA foi realizada pela análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, e as amostras foram diluídas em água ultrapura e padronizadas para uma concentração final de 2,5 ng μ L.

6.2.3 Genotipagem via marcadores SSR

As reações de amplificação via PCR foram completadas para o volume final de 15 μ L contendo 10 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM (Mix 2) ou 2,5 mM (Mix 5) de MgCl₂ (Tabela 2), 0,2 mM de dNTP, 0,2 mM de cada iniciador, 1U da Taq DNA Polimerase. As amplificações foram conduzidas em termociclador *Applied Biosystems* com um ciclo de desnaturação a 94 °C por 3 min; 27 ou 30 ciclos a 94 °C por 40s, 55, 56, 58 ou 60°C por 40s, 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 5min.

Foram utilizados quatorze iniciadores de SSR (Tabela 2). A eletroforese foi realizada em gel 3% de agarose e coloração com brometo de etídeo, visualizados sob luz UV e fotografado em sistema fotodocumentação (Vilber Lourmat). O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 50 pb (Promega).

6.2.3 Análise dos dados morfológicos, moleculares e morfo-moleculares

Para os dados morfológicos foi realizada análise de agrupamento considerando os descritores quantitativos e qualitativos simultaneamente, segundo o algoritmo de Gower (Gower, 1971). O agrupamento hierárquico a partir da matriz de distâncias genéticas foi obtido pelo método Ward-MLM. Para a definição do número de grupos utilizou-se o critério do ponto de fusão, segundo Mingoti (2005). A validação dos agrupamentos foi determinada por meio do cálculo do coeficiente de correlação cofenético (Sokal e Rohlf, 1962). A matriz de distância genética utilizando o algoritmo de Gower foi obtida pelo programa SAS – *Statistical Analysis System* (SAS Institute, 2006) e o dendrograma de dissimilaridade pelo programa Statistica 7.1 (Statsoft, 2005).

Para os dados moleculares os fragmentos foram genotipados com base no seu tamanho, em pares de bases (pb), em comparação com padrão de peso molecular ladder 50-pb. A matriz de distância genética, a estruturação da diversidade genética e o dendrograma foram obtidas pelo programa PowerMarker, utilizando a matriz de distância combinada.

Foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de dissimilaridades genéticas e a matriz dos valores cofenéticos. O número de alelos por loco e conteúdo informativo (PIC - Polymorphic information content) foram obtidos com o auxílio do programa PowerMarker (Liu & Muse, 2005).

Para a análise conjunta, as características quantitativas e qualitativas (multicategórica e molecular) foram analisadas simultaneamente usando o método de agrupamento Ward-MLM, considerando a matriz conjunta obtida a partir do algoritmo de Gower. A matriz de distância genética utilizando o algoritmo de Gower foi obtida pelo programa SAS. Foi calculado o coeficiente de correlação cofenético e para obtenção do dendrograma foi utilizado o programa Mega 4.1 (Tamura et al., 2007).

6.3 Resultados e Discussão

Foram utilizados 14 iniciadores SSR para a caracterização dos 30 acessos do gênero *Manihot*. Dos 14 iniciadores testados 10 detectaram polimorfismo. Resultado semelhante foi relatado por Ribeiro *et al.*(2011), trabalhando com iniciadores microssatélites em mandioca, em que dos 14 iniciadores utilizados 12 detectaram polimorfismo. O iniciador EME 445 foi monomórfico e três iniciadores não detectaram amplificação em nenhum dos acessos.

O número de alelos obtidos foi 57 com média de 5,7 alelos por iniciador. O maior número de alelos foi identificado nos iniciadores SSRY 12 e SSRY 81 (10 alelos) e o menor número no iniciador EME 425 (2 alelos). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,14 para o iniciador EME 425 a 0,84 para o iniciador SSRY 81, com média de 0,47 (Tabela 6).

Tabela 6. Iniciadores microssatélites, sequência dos primers forward (F) e reverso (R), número de alelos e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Cruz das Almas, 2012.

| Iniciadores SSR | Sequência (F/R) (5' – 3') | Nº de Alelos | PIC |
|-----------------|--|--------------|----------|
| SSRY 12 | aactgtcaaaccattctactgc/gccagcaaggttgctacat | 4 | 0.478284 |
| SSRY 77 | aggaggtggcagattttgt/gcatgtccacctgcataag | 5 | 0.542595 |
| SSRY 81 | ggcgatttccatgcatgctt/tgattttctgcgtgatgagc | 3 | 0.454185 |
| SSRY 82 | tgtgacaataaccaccgacagga/caccatcggcattaaacttg | 10 | 0.822953 |
| SSRY 101 | ggagaataaccaccgacagga/acagcagcaatcaccatttc | 10 | 0.844899 |
| SSRY 103 | tgagaaggaaactgcttgac/cagcaagaccatcaccagttt | 6 | 0.689529 |
| SSRY 105 | caaacatctgcacttttggc/tcgagtggcttctggtcttc | 6 | 0.69487 |
| SSRY 106 | ggaaactgcttgcaaaaga/cagcaagaccatcaccagttt | 5 | 0.604211 |
| SSRY 165 | aaatgagttgcaaaggccaa/ggtaacaaatgatgtggtgttc | 6 | 0.655458 |
| EME 425 | Cctccacaaccttatcaatca/cggtagccatagccataaca | 2 | 0.145139 |
| Total | | 57 | 0.593212 |
| Média | | 5.7 | 0.478284 |

O coeficiente de correlação cofenético (0,92**) foi maior na análise que considerou os dados quantitativos, categóricos e moleculares simultaneamente, através do método Ward-MLM. Para dados morfológicos o CCC foi (0,82**) e para dados moleculares (0,82**). Conforme sugerem Bussab *et al.* (1990), análises de agrupamento são aceitáveis se produzirem um CCC a partir de 0,80.

Em todas as análises *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia* foi a mais divergente quando comparada com as demais espécies, apresentando uma distância de fusão entre os demais grupos relativamente alta. A distinção de *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia* já era esperada por esta espécie ser considerada entre os mais próximos ancestrais da mandioca e relacionada às espécies da seção *Heterophyllae* (Duputié *et al.*, 2011; Allem, 2002, 1999; Olsen, 2002,).

Os acessos da espécie identificada com o código de campo *M. COMDF* formou um grupo à parte estando próximos em todas as análises aos grupos das espécies *Manihot violacea* e *Manihot cecropiefolia* (espécies da seção *Quinquelobae*). Essa espécie apresenta características que a aproximam das demais da seção *Quinquelobae*; sobretudo a coloração das folhas e a inflorescência racemosa, mas difere quanto ao porte mais elevado, à inflorescência longa (atingindo mais de 30 centímetros) e à distribuição restrita à Chapada Diamantina, uma vez que, com exceção de *M. jacobinensis*, as demais espécies desta seção ocorrem no cerrado do estado de Goiás e no Distrito Federal. Essas diferenças reforçam a hipótese de que essa espécie seja um novo táxon e sugere que mais estudos sejam feitos nesse sentido.

Manihot violacea aparece em todas as análises com maior proximidade com *M. cecropiaefolia* (Figura 3, 4 e 5). Allem (1984) coloca *M. cecropiaefolia* como uma variedade de *M. violacea* com base nas características da epiderme de suas folhas. As características anatômicas usadas pelo autor para esse novo tratamento, como tipo do complexo estomático e ornamentação da cera epicuticular, não foram usadas no presente estudo, o que dificulta qualquer posicionamento conclusivo.

Além de *M. cecropiefolia*, Allem (1984) considera mais duas variedades e uma subespécie para *M. violacea* (*M. violacea* var. *violacea*, *M. violacea* var. *divergens* e *M. violacea* subsp. *jacobinensis*). Entretanto, Rodrigues (2007) reconhece para o Distrito Federal apenas duas variedades, *M. violacea* var. *violacea* e *M. violacea* var. *cecropiefolia*, diferenciando-as pela inflorescência brotrióide ou panícula, forma da base foliar e ausência ou presença de verticilos de brácteas na base da inflorescência. Rogers e Appan (1973) também fazem a distinção com base na inflorescência, considerando as variedades *violacea* (uma inflorescência simples) e *cecropiefolia* (um aglomerado de inflorescências) como espécies distintas, porém relacionadas. No presente trabalho, não foram identificadas panículas em nenhuma destas variedades. No entanto, foram detectadas diferenças no formato dos lobos

foliares, no comprimento das inflorescências e formato das brácteas, evidenciando distinções morfológicas entre esses materiais.

Os resultados desse trabalho corroboram a proximidade entre as duas espécies, o que é reforçado pela sua proximidade geográfica e sugerem que mais estudos sejam feitos a fim de esclarecer o seu posicionamento.

Em todas as análises a proximidade da espécie *M. irwinii* com *M. tomentosa* é identificada. *M. tomentosa* faz parte da seção *Grandibracteatae*; diferente da seção de *M. irwinii* (Sect. *Quinquelobae*), contudo, compartilha o mesmo hábito arbustivo e habitat (cerrado) dessa espécie. Duputié *et al.* (2011) apresentam resultados semelhantes, com *M. tomentosa* próxima à *M. irwinii*, *M. cecropiaefolia* e *M. violacea*. Esses resultados sugerem que essa espécie possa ser incluída na seção *Quinquelobae*, uma vez que a seção *Grandibracteatae* aceita por Rogers e Appan, (1973) é monoespecífica.

Manihot jacobinensis mostrou maior similaridade com *M. violacea* em apenas uma das análises (Figura 4), o que coloca em dúvida seu posicionamento como subespécie de *M. violacea* como sugerido por Allem (1984). *Manihot jacobinensis* ocorre na caatinga nordestina, em meio à vegetação arbustiva, e na Chapada Diamantina, enquanto *M. violacea* ocorre no cerrado. Duputié *et al.* (2011) sustentam que as espécies de *Manihot* podem assumir formas distintas desde que estejam em ambientes diferentes e sugerem cautela na diferenciação das espécies do gênero. Ao mesmo tempo os autores apontam como relevante a influência biogeográfica para a filogenia do grupo. A diferenciação morfológica (Figura 3) dessas espécies em cultivo na coleção da Embrapa, portanto, no mesmo ambiente, associada a sua ocorrência na natureza, parece sustentar seu reconhecimento enquanto espécies distintas.

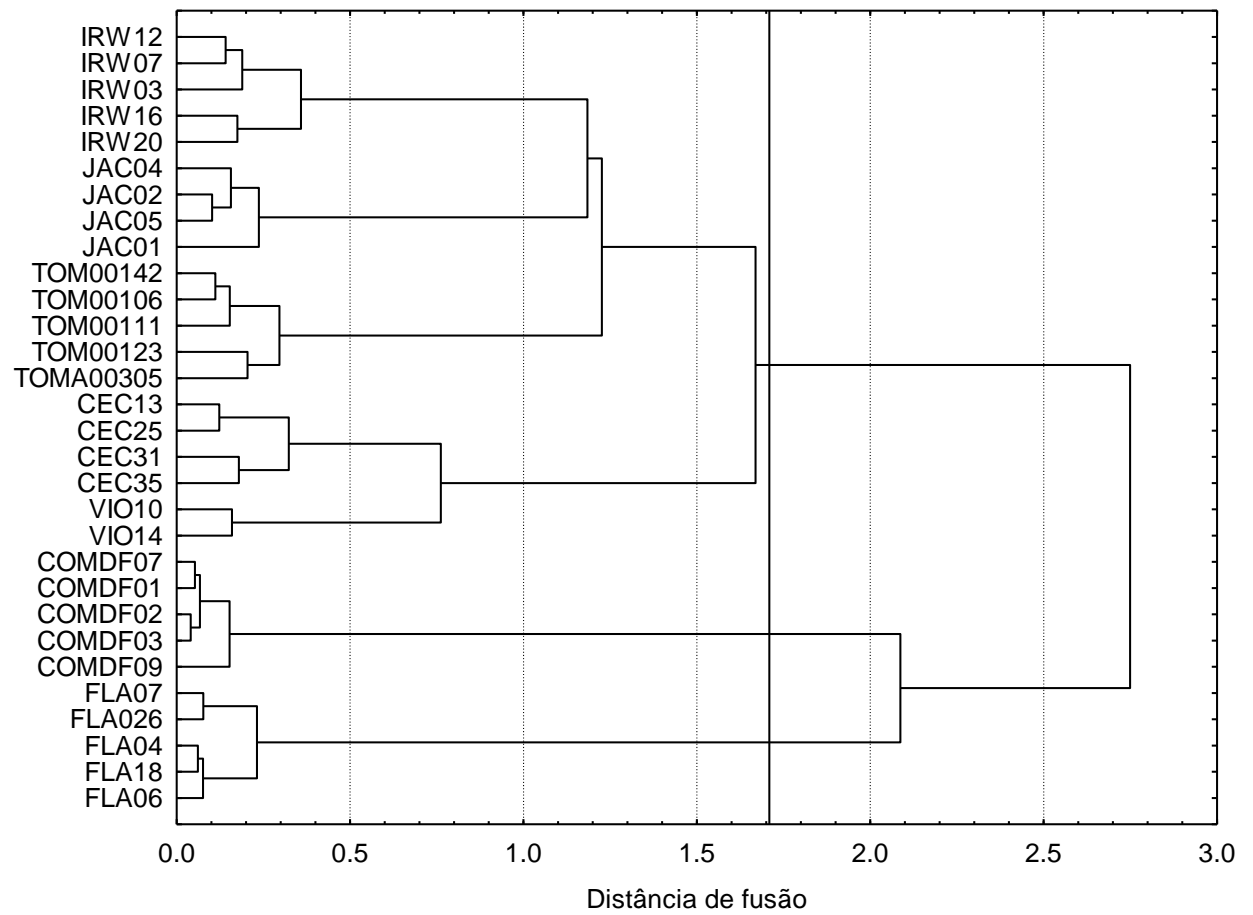


Figura 3. Dendrograma obtido pelo método Ward, a partir da dissimilaridade genética entre 30 acessos de *Manihot*, utilizando descritores morfológicos. Linha indica ponto de corte de acordo com a distância de fusão.

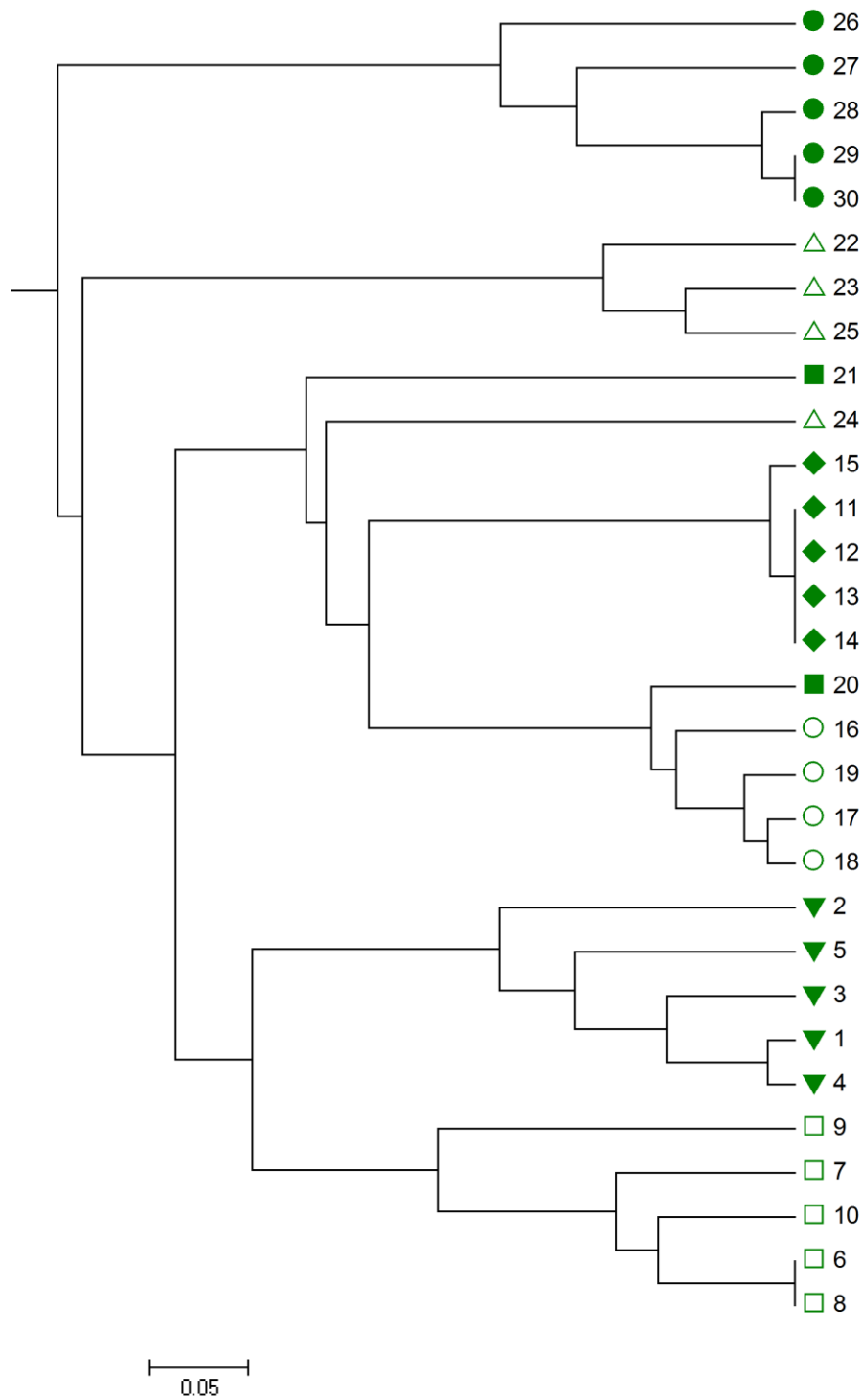


Figura 4. Dendrograma obtido pelo método Ward, a partir de dados moleculares obtidos de 30 acessos de *Manihot*, utilizando marcadores SSR. Cada espécie está identificada com um símbolo distinto. 1-5 (IRW), 6-10 (TOM), 11-15 (COM DF), 16-19 (CEC), 20-21 (VIO), 22-24 (JAC) e 26-30 (FLA).

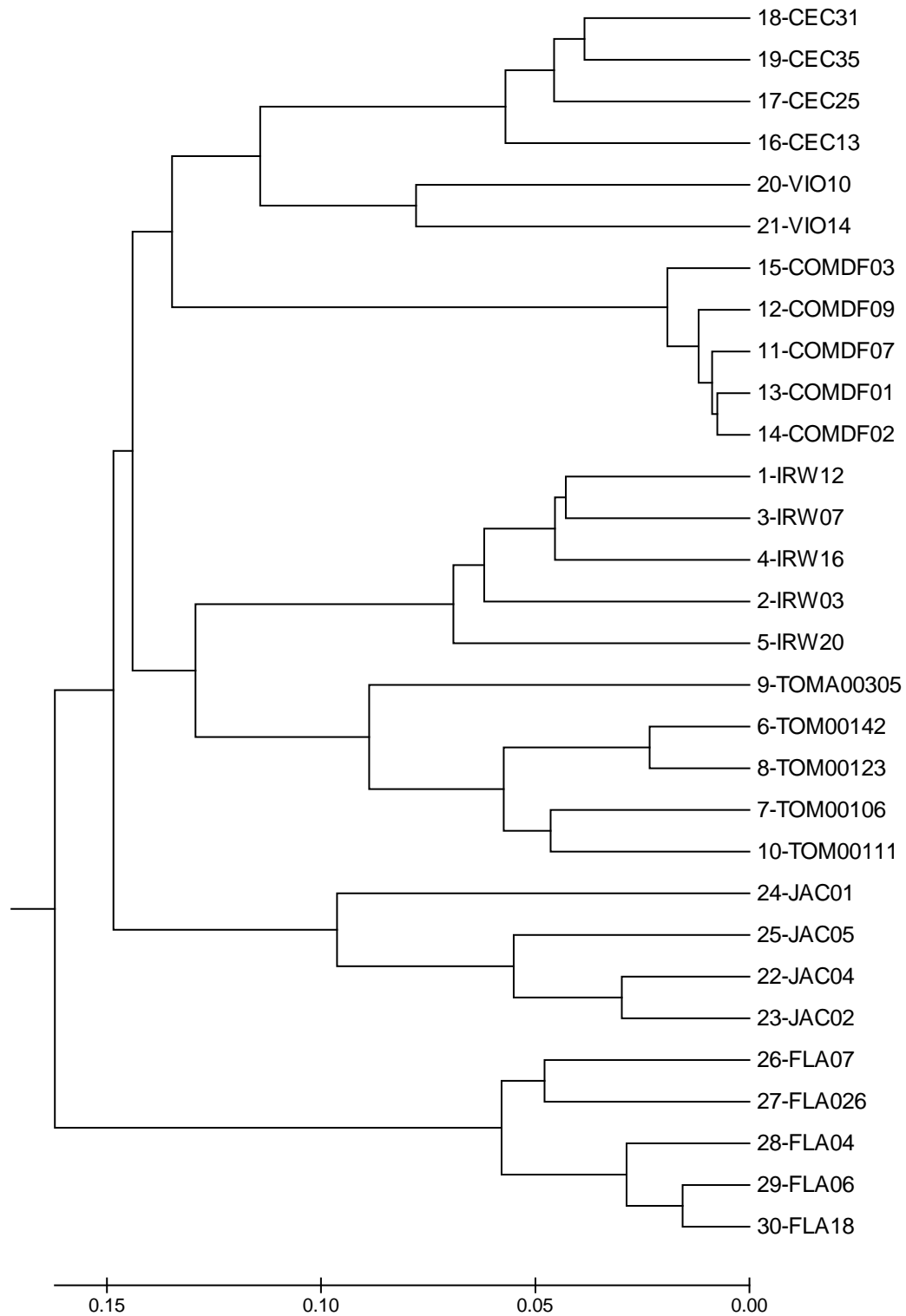


Figura 5. Dendrograma obtido pelo método Ward, utilizando dados morfológicos, categóricos e de marcadores SSR simultaneamente de 30 acessos de *Manihot*.

6.4 Conclusões

Os microssatélites delimitaram grupos de espécies com forte correspondência biogeográfica.

O posicionamento taxonômico de *M. cecropiaefolia* ainda é incerto e mais estudos são necessários para uma definição mais precisa. A sustentação da seção *Grandibracteatae* deve ser revista a partir da similaridade entre *M. tomentosa* e as demais espécies da seção *Quinquelobae*.

A morfologia e distribuição de *Manihot jacobinensis* sugerem seu reconhecimento como táxon distinto de *M. violacea*. A espécie com código de campo *M. COMDF* pode, de fato, tratar-se de um novo táxon e seu posicionamento nas análises demonstra uma possível relação com as espécies da seção *Quinquelobae*.

REFERÊNCIAS

- ADANSON, M. **Familes de Plantes**. II. Partie. Paris. P. 356. 1763.
- ALLEM, A. C. Notas taxonômicas e novos sinônimos em espécies de *Manihot* – II (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Biologia** 38(3):721-726. Rio de Janeiro, RJ. 1978.
- ALLEM, A. C. Notas taxonômicas e novos sinônimos em espécies de *Manihot* – IV. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Biologia** 39: 753-738. . Rio de Janeiro, RJ. 1979.
- ALLEM, A.C. A **Revision of *Manihot* section *Quinquelobae* (Euphorbiaceae)**. Tese de Doutorado. University of Reading. 305p. 1984.
- ALLEM, A.C. Four new species of *Manihot* (Euphorbiaceae) from Brazil. **Revista Brasileira de Biologia** 49(3): 649-662. Rio de Janeiro, RJ.1989b.
- ALLEM, A.C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genet. Resour. Crop. Evol.** 41, 133–150. 1994.
- ALLEM, A.C. A new species of *Manihot* (Euphorbiaceae) from Brazilian Amazon. **International Journal of Plant Sciences** 160(1): 181-187. Chicago. USA. 1999.
- ALLEM, A. C. Three new infraespecific taxa of *Manihot* (Euphorbiaceae) from the Brazilian neotropics, **Novon** 11(2): 157-165. Brasilia, Distrito Federal. 2001.
- ALLEM, A.C. The origins and taxonomy of cassava. In: Hillocks, R.J., Thersher, J.M., Belloti, A.C. (Eds.), **Cassava: Biology, Production and Utilization**. CABI Publishing, New York, pp. 1–16. 2002.
- AMORIM, E. P.; REIS, R. V.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O. e SILVA, S. O. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.8, p.1045-1052, ago. 2008
- ARAÚJO, D. G. de. Caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum) utilizando descritores de fruto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n.1, p. 13-21, jan./mar.2002.
- BEECHING, J.R., Marmey, P., Gavalda, M.C., Noirot, M., Haysom, H.R., Hughes, M.A., Charrier, A., An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. **Ann. Bot.** 72, 515–520. 1993.
- BELLON, G. et al. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.
- BERTRAM, R.B. **Application of molecular techniques to genetic resources of cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae): interspecific evolutionary relationships and intraspecific characterization**. PhD thesis, University of Maryland, Maryland. 1993.

BONOW, S.; PINHO, E. V. R. V.; SOARES, A. A., SIÉCOLA JUNIOR, S. Caracterização morfológica de cultivares de arroz visando a certificação da pureza varietal. **Ciência Agrotecnológica**. Lavras, v.31, n.3 p. 619-627. 2007.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. Ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 532 p.

BRANDÃO, L.P. **Seleção de descritores morfoagronômicos em bananeira por meio de procedimentos uni e multivariados**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 61 p. 2011.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRALLAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellites markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, n. 5-6, p. 816-827. 1998.

BUSSAD, W. de O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: ABE, 1990. p. 105.

CABRAL, G. B.; CARVALHO, L.J. C. B.; SCHAAL, R. A. Relationship analysis of closed related species to cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on microsatellite-primed PCR. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 4., 1998, Salvador. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 36-50.

CABRAL, P. D. S.; SOARES, T.C.B.; GONÇALVES, L.S.A.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; LIMA, A.B.P.; RODRIGUES, R.; MATTA, F.P. Quantification of the diversity among common bean accessions using Ward-MLM strategy. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, 2010, v.45, p.1124-1132.

CARVALHO, P. C. L. Biossistemática de *Manihot*. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A. R. N.; MATOS, P. L.P. de; FUKUDA, W. M. G. (Org.). **Aspectos Socioeconômicos e Agronômicos da Mandioca**. 1 (Ed.) Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2006, v. 1, p. 112-125.

CERQUEIRA, P. H. R.; LEANDRO, R. A.; CESPEDES, J. A.; SOUZA JUNIOR, C. L. e SOUZA, A. P. Agrupamento de dados de marcadores moleculares dominantes utilizando o método de classificação de padrões supervisionado. 2011. Disponível em: http://www.ime.unicamp.br/sinape/sites/default/files/Sinape%202_0.pdf. Acesso em: 20 de janeiro de 2012.

CHACON, J. MADRIÑAN, S., DEBOUCK, D., RODRIGUEZ, F. & TOHME, J. Phylogenetic patterns in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) inferred from analyses of nuclear and chloroplast DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49, 260–267. 2008.

CHAVARRIAGA-Aguirre, P., MAYA, M.M., THOME, J., DUQUE, M.C., IGLESIAS, C., BONIERBALE, M.W., KRESOVICH, S., KOCHERT, G., Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava

- core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. **Mol. Breeding** 5, 263–273. 1999.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germ plasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.1, p. 189-199, 2000.
- CORDEIRO, I. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Euphorbiaceae. **Bolm Botânica Universidade de São Paulo**, 13: 169-127, São Paulo, SP. 1992.
- CORDEIRO, G.M.; CASU, R.; McINTYRE, C. L.; MANNERS, J. M.; HENRY, R.J. 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. **Plant Science** 160:1115-1123.
- COSTA, F.R.; PEREIRA, T.N.S.; VITORIA, A.P.; CAMPOS, K.P.; RODRIGUES, R.; SILVA, D.H.; PEREIRA, M.G. 2006. Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 6: 18-23.
- COSTA, J. C. da. Utilização de marcadores ISSR na caracterização de cultivares. Recife, UFRPE. 2010. Disponível em: <http://lira.pro.br/wordpress/wpcontent/uploads/downloads/2010/11/revisão-jose-carlos.pdf>. Acesso em: 20 de dezembro de 2011.
- CRESTE, S.; TUMANN NETO, A.; SIVA, S. de O.; FIGUEIRA, A. Genetic characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Brazil using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v.132, p. 259-268, 2003.
- CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 1990. 188 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- DAYANADAN, S.; BAWA, K. S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 84, n. 12, p. 1658-1663. 1997.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DUPUTIÉ, A., SALICK, J., MCKEY, D. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. **Journal of Biogeography**. 1(1):1-11. 2011.
- EKANDEM, M.J. Cassava research in Nigeria before 1967. **Ibadan: Federal Department of Agricultural Research**, 1970, 16p. (memorando 103, mimeografado).
- FALEIRO, F. G.; BARROS, A.M.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R.; KARIA, C.T.; GOMES, A.C.; ANDRADE, R.P. Caracterização molecular e estabelecimento de coleção de trabalho de *Stylosanthes macrocephala* com base em marcadores RAPD. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003b. 1 CD-ROM.
- FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares. Planaltina: Editora Embrapa, 2007. 102p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1998. 220p.

FERREIRA, M.E. Molecular analysis of gene Banks for sustainable conservation and increased use of crop genetic resources. In: RUANE, J.; SONNINO, A. **The role of biotechnology in exploiting and protecting agricultural genetic resources**. Roma:FAO, 2006, p. 121-128.

FREGENE, M.A., VARGAS, J., ANGEL, F., TOHME, J., ASIEDU, R.A., AKORADA, M.O., ROCA, W.M., Chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA variability in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. **Theor. Appl. Genet.** 89, 719–727. 1994

FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; VILARINHOS, A.D.; OLIVEIRA, R.P. **Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização**. Embrapa-CNPMP: Cruz das Almas-Bahia, 1996. (Documento).

FUKUDA, W. M. G., GUEVARA, C. L. **Descritores morfológicos e agrônômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas: Embrapa – CNPMP, 1998. 38p. (Embrapa-CNPMP. Documentos, 78).

FUKUDA, W. M. G. Prioridades futuras de um programa melhoramento de mandioca. In: REUNIÓN PANAMERICANA DE FITOMEJORADORES DE YUCA, 3., 1994, Cali. **Memorias...** Cali: Ciat, 1994. p. 261-269. (Ciat. Documento de Trabajo, 138).

FUKUDA, W. M. G. **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**, Embrapa Mandioca e fruticultura Tropical; Wânia Maria Gonçalves Fukuda, Cruz das Almas BA 2006.

GAO, L.; TANG, J.; LI, H.; JIA, J. 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. **Molecular Breeding** 12:245-261.

GAUDEUL, M.; TILL-BOTTRAUD, I.; BARJON, F.; MANEL, S. Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. **Heredity**, 92, 508–518, 2004.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**. v. 27, n. 4, p. 857 - 874, 1971.

HU, J.; NAKATANI, M.; LALUSIN A.G.; FUJIMURA, T. 2004. New microsatellite markers developed from reported *Ipomoea trifida* sequences and their application to sweetpotato and its related wild species. **Scientia Horticulturae** 102: 375-386.

JENNINGS, D.L. Breeding for resistance to cassava viruses in East Africa. In: **CASSAVA MOSAIC WORKSHOP**, Ibadan, 1972. Proceedings... Ibadan:IITA, 1972. p.40-42.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A. e STEVENS, P. F. **Plant Systematic: a Phylogenetic Approach**. Ed. Sinauer Associates, Inc. 1999.464p.

KARIA, C. T. Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW. [manuscrito]. 2008 p. 50: Disponível em: <http://pct.capes.gov.br/teses/2008/52001016006P5/TES.pdf>. Acesso em: 20 jan. de 2012.

KULEUNG, C.; BAENZIGER, P.S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.1147-1150, 2004.

LEDO, C.A.S.; TAVARES FILHO, L.F.Q.; OLIVEIRA, M.M., SILVEIRA, T.C.; SANTOS, A.S.; ALVES, A. A. C.; GONÇALVES, L. S. A. Análise de agrupamento utilizando variáveis quantitativas e qualitativas para o estudo da diversidade genética em genótipos de mandioca silvestre. In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2009. **Resumos...** Botucatu: SBM, 2009.

LEVI, A.; THOMAS, C. E.; KEINATH, T. C. Estimation of genetic diversity among *Citrullus* accessions using RAPD markers. **Acta Horticulturae**, v.510, p. 385 – 390, 2000.

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

MARDIA, A. K. V.; KENT, J. M. Multivariate analysis. London: Academic Press, 518p.1997.

MARQUEZ-LEMA, A.; VELASCO, L.; PÉREZ-VICH, B. Transferability, amplification quality, and genome specificity of microsatellites in *Brassica carinata* and related species. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 51, n.2, p.123-131, 2010.

MILACH, S. C. K. Uso de Marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A. et. al. (Eds.). **Biossegurança, na proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa: UFV, 1998. 182 p.

MILLER, P. **The Gardeners Dictionary**, 4th Ed., Vol. II London. 1754.

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

MISSIO, R. F.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; PENA, G. F.; ZAMBOLIM, L.; DIAS, L. A. S. e SAKIYAMA, N. S. Genetic characterization of an elite coffee germplasm assessed by gSSR and EST-SSR markers. **Genetics and Molecular Research** 10 (4): 2366-2381, 2011.

MOYLE, L.C., OLSON, M.S. & TIFFIN, P. (2004) Patterns of reproductive isolation in three angiosperm genera. **Evolution**, 58, 1195–1208.

MULATO, B. M. **Diversidade genética em germoplasma de soja identificada por marcadores SSR, est-ssr e caracteres agromorfológicos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba – São Paulo. 293p. 2000.

MULLER, J. In: **De Candolle, Prodrromous** 15(2):1073. 1866.

MULLER, J. **Euphorbiaceae**. In: Flora Brasiliensis. C. F. P. de Martius e A. G. Eichler. Vol. 11 parte 2. J. Cramer, 1967, Lehre. P. 752p. 1873/74.

MÜHLEN G.S.; MARTINS, P.S. e ANDO, A. Variabilidade Genética de etnovarietades de mandioca avaliada marcadores moleculares Por de DNA. **Scientia Agricola** **57** : 319-328. 2000.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.) **Recursos Genéticos & Melhoramento**. Rondonópolis. 2001. p. 29-55.

NASSAR, N.M.A. Wild cassava *Manihot* spp.: biology and potentialities for genetic improvement. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.201-212, 2000.

NASSAR, N. M. A. Mandioca: Uma opção contra a fome estudos e lições do Brasil e do mundo. **Ciência hoje**, vol. 39, n.231, p. 31-34, 2006.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LAMALFA,S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

NIENHUIS, J ; TIVANG, J. and SKROCH, P. Analysis of genetic relationships among genotypes based on molecular marker data, p. 8-14. In: Analysis of molecular marker data. Joint Plant Breeding **Symposia series**, 5-6 Aug. 1994, ASHS-CSSA, Corvallis, Ore.

OLIVEIRA, E.J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

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

PÁDUA, J. G. **Análises genéticas de espécies do gênero *Passiflora* L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites**. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, ESALQ/USP. 127p. 2004.

PARKS, C.R. & WENDEL, J.F. (1990) Molecular divergence between Asian and North American species of *Liriodendron* (Magnoliaceae) with implications for interpretation of fossil floras. **American Journal of Botany**, 77, 1243–1256.

PAX, F. Euphobiaceae – *Manihot* Adans. In: **Das Pflanzenreich. Regni vegetabilis conspectus** (A. Engler, Ed.), 147 (heft 44): 21-111, 1910.

PEREIRA, L.S., GOMES, V. M., FERNANDES, K. V. S. *et. al.* Proteínas inseticidas e antifúngicas do látex de *Manihot glaziovii* Muell. Arg. **Rev. bras. Bot.**, 22(1) p. 27-30. São Paulo. SP. 1999.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S. Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG, 2006, p. 85-106.

PEREIRA, V. M. **Variabilidade genética utilizando marcadores SSR e comportamento agrônomo de diplóides melhorados de bananeira.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 71p. 2011.

POHL, J. **Plantarum Brasilliae Ícones et Descriptores.** 1:17-56. 1827.

PUJOL, B., GIGOT, G., LAURENT, G., PINHEIRO-KLUPPEL, M., ELIAS, M., HOSSAERT-MCKEY, M. & MCKEY, D. (2002) Germination ecology of cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) in traditional agroecosystems: seed and seedling biology of a vegetatively propagated domesticated plant. **Economic Botany**, 56, 366–379.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado:** aproximación técnica y socioeconómica. Lima, Perú, 1988. 218p.

RAINA, S.N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R.M. RAPD and SSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 763-772, 2001.

RIBEIRO, M. N. O.; CARVALHO, S. P.; SANTOS, J. B E ANTONIO, R. P. Genetic variability among cassava accessions based on SSR markers. **Rev. Crop breeding and applied biotechnology**, v.11, n. 3, p.263-269, set. 2011.

RODRIGUES, A.S. **As tribos Dalechampeae Mull. Arg. e Manihoteae Melchior (Euphorbiaceae) no Distrito Federal, Brasil.** Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília. 115p. 2007.

ROGERS, D. J. e APPAN, S. G. *Manihot Manihotoides* (Euphorbiaceae). **Flora Neotropica**. Monograph no. 13. Hafner Press. New York, USA. 1973.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A. e RIBEIRO, H. L. C. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.1, p.49-55, jan. 2010.

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

SEAB, **Análise da conjuntura agropecuária.** 2007. Disponível em: www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/.../mandioca_2007_08.doc. Acesso em 12 dez. 2011.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numeric taxonomy: the principles and practice of numerical classification.** **San Francisco:** W.H. Freeman, 573p. 1973.

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. [Molecular Biology and Evolution](http://www.molbiol.org) 24: 1596-1599. 2007.

TANKSLEY, S.D., MCCOUCH, S.R., Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science** 277, 1063–1066. 1997.

VALLS, J. F. M. Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. P. 281-305, 2007.

VAN SLOTEN, D. H. **The use of curators, breeders and other users of germplasm in characterization and evaluation of crop genetic resources**. Rome: IBPGR/SEAN, 1987. p. 3-8. Special Issue.

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

VILELA, F. O. *et al.* Effect of recurrent selection on the genetic variability of the UNB-2U popcorn population using RAPD markers. **Revista Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 25-30, 2008.

WANYERA NMW, HAHN e SK AKEN'OVA ME (1992) introgressão do Ceará borracha (*Manihot glaziovii* Muell-Arg) em mandioca (*M. esculenta* Crantz): a evidência morfológica e de electroforese. Em Akoroda MO (ed.) **Proceedings de tubérculos para a segurança alimentar em África** . Africa Branch, Ibadan, p. 125-130.

WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, D. C. Cianeto nas folhas e farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Ciênc. Agrotec.**, v.28, n. 5, p 1115-1118, set.out., Lavras, MG. 2004.

ANEXO I

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDO VEGETAL (MINI-PREP)

(Doyle & Doyle, 1987, com modificações)

SOLUÇÃO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

| SOLUÇÕES/REAGENTES/CONC. FINAL | V. FINAL 10 mL |
|-------------------------------------|----------------|
| CTAB a 10% 2,0 % | 2,0 mL |
| NaCl a 5 M 1,4 M | 2,8 mL |
| Tris HCl a 1M pH 8,0 0,1 M | 1,0 mL |
| EDTA a 0,5 M 20 mM | 400 µL |
| 2-mercaptoetanol 0,4 % | 40 µL |
| PVP (Polivinilpirrolidona) 1,0 % | 0,1 g |
| H ₂ O de milli-Q | 3,76 mL |

1. Coletar as amostras de folhas de plantas, de preferência jovens e saudáveis, evitando áreas atacadas por pragas e doenças. De modo geral deve-se lavar as folhas em água corrente, usando sempre que necessário detergente. Enxaguar com água destilada e secar com papel toalha.
2. Macerar 300 mg do tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido ou diretamente no tubo usando um micro-pistilo.
3. Transferir a amostra para tubo de eppendorf de 2 mL e adicionar 700 µL da solução tampão de extração a 65°C. Homogeneizar suavemente, pôr inversão, durante 5 minutos.
4. Incubar os tubos em banho-maria a 65°C por 45 minutos, e homogeneizar a cada 15 minutos.
5. Retirar do banho-maria.
6. Adicionar 700 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente.
7. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
8. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos.
9. Adicionar 700 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente.

10. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
11. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos.
12. Adicionar 450 μ L de álcool Isopropílico (gelado). Tem que ser equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado. Homogeneizar suavemente, incubar a (-20°C) por 20 minutos.
13. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
14. Ressuspender o DNA isolado em 600 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e adicionar 200 μ L de acetato de amônio a 7,5 M.
15. Fechar o tubo e misturar suavemente por inversão para homogeneizar a solução. Incubar no gelo por 15 minutos.
16. Centrifugar por 15 minutos a 12.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
17. Adicionar 800 μ L de ETANOL ABSOLUTO ao sobrenadante e misture suavemente por inversão. Incube por 1 hora a -20°C.
18. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
19. Lavar o precipitado com etanol 70% gelado (v/v) (500 μ L) e centrifugar novamente nas mesmas condições anteriores por 3 minutos.
20. Secar o precipitado e dissolver em 100 μ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + 1 μ L de RNase (10 mg/ml).
21. Colocar na estufa à 37°C durante 1 hora.
22. Armazenar o DNA a -20°C .

ANEXO II

Tabela 7: Reagentes para preparo do Mix 2 para PCR.

| Reagentes | Vol. Final 15 μ L | Quantidade (1 amostra) |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| Água Mili-Q | | 5,85uL |
| dNTP 2,5mM | 0,2mM | 1,2uL |
| Tampão 10x | 1X | 1,5uL |
| MgCl ₂ – 50mM | 2,5mM | 0,45uL |
| Taq (4U/uL) | 1U | 0,5uL |
| Primer R/F (2mM) | 0,2mM | 1,5uL |
| DNA 2,5 ng/uL | 10ng | 4uL |

Tabela 8: Reagentes para preparo do Mix 5 para PCR.

| Reagentes | Vol. Final 15 μ L | Quantidade (1 amostra) |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| Água Mili-Q | | 5,55uL |
| dNTP 2,5mM | 0,2mM | 1,2uL |
| Tampão 10x | 1X | 1,5uL |
| MgCl ₂ – 50mM | 2,5mM | 0,75uL |
| Taq (4U/uL) | 1U | 0,5uL |
| Primer R/F (2mM) | 0,2mM | 1,5uL |
| DNA 2,5 ng/uL | 10ng | 4uL |