

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

**AVALIAÇÃO DA ENDOGAMIA E MORFOLOGIA DE
GRÂNULOS DE AMIDO EM PROGÊNIES S₁ DE MANDIOCA**

Paulo Henrique Gomes Alves de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
2017**

AVALIAÇÃO DA ENDOGAMIA E MORFOLOGIA DE GRÂNULOS DE AMIDO EM PROGÊNIES S₁ DE MANDIOCA

Paulo Henrique Gomes Alves de Oliveira
Engenheiro Agrônomo
Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Dra. Claudia Fortes Ferreira
Coorientador: Dr. Eder Jorge de Oliveira

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

O48a	<p>Oliveira, Paulo Henrique Gomes Alves de.</p> <p>Avaliação da endogamia e morfologia de grânulos de amido em progênies s1 de mandioca / Paulo Henrique Gomes Alves de Oliveira._ Cruz das Almas, BA, 2017.</p> <p>82f.; il.</p> <p>Orientadora: Claudia Fortes Ferreira. Coorientador: Eder Jorge de Oliveira.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,</p> <p>CDD: 633.68</p>
------	--

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

**AVALIAÇÃO DA ENDOGAMIA E MORFOLOGIA DE GRÂNULOS DE
AMIDO EM PROGÊNIES S₁ DE MANDIOCA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação
Paulo Henrique Gomes Alves de Oliveira

Aprovado em 25 de agosto de 2017

Prof^a. Dr^a. Claudia Fortes Ferreira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Simone Alves Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
(Examinador Interno)

Dr^a. Luciana Alves de Oliveira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

A Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (EMBRAPA), centro Mandioca e Fruticultura, pela concessão de uso dos laboratórios e campos experimentais para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A minha orientadora Cláudia Fortes Ferreira e coorientador Eder Jorge de Oliveira, pelos conhecimentos adquiridos e compartilhados ao longo do mestrado.

A minha família pelo incentivo, em especial a minha mãe por sempre ter sido meu maior exemplo de força, determinação e coragem.

A Claudia Oliveira Barbosa que foi meu braço direito em todo o desenvolvimento do projeto, e que para além das relações de trabalho desenvolvemos vínculos fraternos muito especiais.

A Manassés por te me acompanho em toda essa jornada me dando conforto e carinho sempre que precisei.

A Cátia (vulgo Mamis) por ser um exemplo para mim de como ser um grande profissional e também por ser uma das pessoas mais maravilhosas que já tive privilégio de conhecer.

A Andresa Ramos, que para além dos auxílios no laboratório de biologia molecular, esteve comigo sempre compartilhando cada passo dessa jornada e sempre fornecendo muito amor #CHEFAdoAMOR.

A Dalma pela companhia e amizade, pelas conversas filosóficas e por todas as energias boas trocadas.

As outras amigas que o mestrado me proporcionou, a Camila, Rafael, Aryana, Leticia, Lucas, Zanon, Patrícia e Lorena, vocês foram todos especiais.

Aos amigos da graduação Giovana, Bruna, Ebert, Edine que me acompanham desde a graduação e foram fundamentais para minha formação acadêmica e pessoal.

A Deus por iluminar todo o caminho percorrido.

A todos supracitados obrigado por tudo, minha sincera gratidão.

AVALIAÇÃO DA ENDOGAMIA E MORFOLOGIA DE GRÂNULOS DE AMIDO EM PROGÊNIES S₁ DE MANDIOCA

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo utilizar a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) para selecionar indivíduos com elevada endogamia, avaliar as alterações morfológicas em grânulos de amido e estimar os ganhos genéticos com a seleção de indivíduos transgressivos em populações autofecundadas (S₁) de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Três acessos foram autofecundados (BGM0222, BGM1378 e BGM1662), gerando um total de 274 indivíduos S₁. Os parentais (S₀) e suas respectivas progênies (S₁) foram avaliados nas fases de *seedlings* e avaliação clonal (CET). Para determinar o coeficiente de endogamia (f) dos indivíduos S₁ foram utilizados 27 iniciadores microssatélites e cinco minissatélites. Na fase de *seedlings*, os amidos dos acessos S₀: BGM0222, BGM1378 e BGM1662 e de suas progênies autofecundas S₁: F0222, F1378 e F1662, foram avaliados para as características área do grânulo (AG, μm^2), perímetro do grânulo (PG, μm), comprimento do grânulo (CG, μm) e número de grânulos de amidos (NG). No CET, as plantas foram avaliadas para: altura de planta (AP), teor de matéria seca nas raízes (MS), produtividade da parte aérea (PPA), produtividade de raízes (PTR) e de amido (PAM). O coeficiente de endogamia (f) dos indivíduos S₁ variou de 0,11 a 0,89 dentro de uma mesma progênie, com média de $f = 0,50$. A seleção de indivíduos S₁ com $f \geq 0,60$ proporcionou em cada progênie S₁, um aumento de 38% na endogamia em relação à média das progênies S₁. O tamanho médio do grânulo de amido variou de 9 a 13 μm entre indivíduos em uma progênie S₁. A presença de transgressivos em relação aos caracteres relacionados à morfologia dos grânulos de amido possibilitou ganhos de seleção expressivos em indivíduos S₁, ou seja, 52%, 31%, 11% e 10% para número de grânulos, área, comprimento e perímetro do grânulo, respectivamente. Os indivíduos com elevado nível de endogamia serão selecionados para novos ciclos de autofecundação diminuindo com isso, o tempo para obtenção de linhagens endogâmicas. Os indivíduos que apresentam características diferenciais para a morfologia do grânulo de amido possuem potencial para explorar diferenças importantes nas propriedades de pasta que definem diversas aplicações industriais do amido.

Palavras Chaves: amido; autofecundação; endogamia; *Manihot esculenta* Crantz

EVALUATION OF INBREEDING AND MORPHOLOGY OF STARCH GRANULES IN S₁ CASSAVA PROGENIES

ABSTRACT: The objective of the present work was to use marker assisted selection (MAS) to select individuals with high inbreeding, evaluate morphological alterations in starch grains and estimate genetic gains with selection of transgressive individuals in self-fertilized (S₁) cassava (*Manihot esculenta* Crantz) populations. Three accessions were self-fertilized (BGM0222, BGM1378 and BGM1662) generating a total of 274 S₁ individuals. The genitors (S₀) and their respective progenies (S₁), were evaluated in the seedlings and clonal phases (CP). In order to determine the inbreeding coefficient (f) of the S₁ individuals, 27 microsatellite and five minisatellite primers, were used. Starch of accessions S₀: BGM0222, BGM1378 and BGM1662 and of their self-fertilized progenies S₁: F0222, F1378 and F1662, were evaluated in the phase of seedlings for the following characteristics: granule area (GA, μm^2), granule perimeter (GP, μm), granule length (GL, μm) and number of starch granules (NG). During the clonal phase (CP), the plants were evaluated for: plant height (PH), root dry matter content (DM), productivity of aerial part (PAP), productivity of roots (PR) and starch (PS). The inbreeding coefficient (f) of the S₁ individuals varied from 0.11 to 0.89 within the same progeny with average of $f = 0.50$. The selection of S₁ individuals with $f \geq 0,60$, resulted in an increase of 38% of inbreeding in comparison to the average of the S₁ progenies. The average size of the starch granule varied from 9 to 13 μm among the individuals in an S₁ progeny. The presence of transgressive individuals as to the characteristics related to morphology of the starch granules enabled expressive selection gains in the S₁ individuals, 52%, 31%, 11% and 10%, for number of granules, area, length and perimeter, respectively. Individuals with high inbreeding levels will be selected for new cycles of inbreeding decreasing time for obtaining inbred lines. Individuals which presented differential characteristics for morphology of the starch granule have potential for exploring important differences in the properties of starch paste, which define many industrial applications of starch.

Key words: inbreeding; self-fertilization; starch; *Manihot esculenta* Crantz

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 1	
SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA AUMENTO DA ENDOGAMIA EM POPULAÇÕES S ₁ DE MANDIOCA	17
Capítulo 2	
VARIAÇÃO MORFOLÓGICA DE GRÂNULOS DE AMIDO EM PROGÊNIES S ₁ DE MANDIOCA	54
CONSIDERAÇÕES GERAIS	83

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais da cultura mandioca

A mandioca é uma espécie diploide $2n=36$ (EL-SHARKAWY, 2003), pertence à classe das Dicotiledôneas, subclasse Archiclamydeae, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, tribo Manihoteae, gênero *Manihot* e à espécie *M. esculenta* Crantz (FUKUDA; IGLESIAS, 2006). No gênero *Manihot*, existem 98 espécies (ORLANDIN; LIMA, 2014), das quais 76 são endêmicas do Brasil. Apenas a espécie *M. esculenta* é cultivada (OLSEN; SCHAAL, 2001) e utilizada em diversas finalidades, embora mais comumente empregada na alimentação humana como fonte de carboidratos disponíveis nas raízes, farinha e amidos, além do uso na suplementação animal e também para aplicações industriais (GUIRA et al., 2016; ECHEBIRI; EDABA, 2008).

Existem divergências sobre o local de origem da mandioca, mas atualmente estudos indicam que a região mais provável seja a região sul da bacia amazônica (OLSEN, 2004). A mandioca foi domesticada a partir do progenitor *M. esculenta ssp. flabellifolia* por povos indígenas nativos da região amazônica, porém a espécie foi difundida para outras regiões e tornou-se uma cultura de grande importância, principalmente no continente Africano (RAMU et al., 2017).

A mandioca é uma planta monoica com sistema reprodutivo, masculino e feminino, separados em uma mesma planta, com alta taxa de polinização cruzada que conduz a uma alta heterozigosidade. Mesmo assim, ainda é observada baixa frequência de autofecundação natural e não existem barreiras fisiológicas que dificultem a autopolinização (HALSEY et al., 2008). A espécie é caracteristicamente um arbusto lenhoso perene (CHETTY et al., 2013), comumente propagada na forma assexuada por meio de segmentos da haste popularmente chamados de manivas. Este método de propagação clonal auxilia na conservação do genótipo durante seu processo de propagação, mantendo-se a elevada heterozigosidade da cultura, cujo mecanismo é favorecido pela biologia reprodutiva e floral da espécie (ELIAS et al., 2001).

Aspectos da produção de mandioca

A área total cultivada de mandioca no mundo em 2014 foi de 23.867 milhões ha, com uma produção de 268 milhões toneladas. O continente Africano é o maior produtor com 54,3% da produção total de mandioca, seguido pelo

Asiático com 33,5% e o continente Americano com 12,1%. O maior país produtor de mandioca em 2014 foi a Nigéria, com aproximadamente 55 mil toneladas, seguido pela Tailândia, Indonésia e Brasil, com uma produção de 30 mil, 24 mil e 23 mil toneladas, respectivamente. No Brasil, a área plantada de mandioca foi de 1.568 milhões de ha em 2014 (FAO, 2016).

O cultivo da mandioca é tradicionalmente realizado por pequenos agricultores para consumo próprio e venda do excedente da produção em pequenas propriedades, principalmente na América latina, Ásia e África, sendo uma importante fonte de calorias para milhares de pessoas nessas regiões e caracterizando-se como uma importante cultura de subsistência (SOUZA et al., 2017). Todavia, o cultivo para abastecer a demanda industrial tem crescido consideravelmente em todo o mundo, e a indústria de alimentos é o maior consumidor do amido de mandioca; embora outros setores como indústria de papel, têxtil, bioetanol, cosméticos dentre outros, também absorvem grandes quantidades de amido (TONUKARI et al., 2015).

Apesar de ser cultivada em todo o território nacional, os estados do Pará, Bahia e Paraná, representam 50% da produção nacional de mandioca (ALBUQUERQUE et al., 2012), embora com realidades bastante diferentes quanto ao sistema de produção. A produção de mandioca para fins agroindustrial na região Centro sul do Brasil, especialmente no Estado do Paraná, tem gerado uma demanda contínua por novas tecnologias relacionadas principalmente ao desenvolvimento de práticas culturais e novas cultivares adequadas à demanda industrial (SAGRILHOS et al., 2008).

Endogamia na cultura da mandioca

Os programas de melhoramento de mandioca baseiam-se principalmente no uso de parentais heterozigóticos em cruzamento inter e intraespecíficos para obtenção de populações segregantes com posterior seleção recíproca fenotípica (CEBALLOS et al., 2016). Em princípio, esse método de condução de população não favorece à endogamia, uma vez que os genitores utilizados são altamente heterozigóticos e os genótipos superiores obtidos são propagados por meio de clones (CEBALLOS et al., 2004), sem chances para novos cruzamentos entre indivíduos aparentados ou ciclos de autofecundação para aumento da homozigose. Entretanto, o melhoramento da mandioca possui algumas limitações

que podem ser superadas pela introdução da endogamia (CEBALLOS et al., 2015).

De modo geral, a mandioca possui elevada carga genética (mutações deletérias) que permanece silenciada pelo seu estado heterozigótico, de tal modo que o acúmulo dessas mutações deletérias foi favorecido principalmente pela propagação vegetativa e a baixa recombinação e endogamia propiciados pelos programas de melhoramento que culminou em uma eliminação ineficaz destes alelos no genoma da mandioca (RAMU et al., 2017). A carga genética é o principal motivo da depressão por endogamia (CHARLESWORTH; WILLIS, 2009).

A elevada heterozigosidade dos genitores nos programa de melhoramento de mandioca tem dificultado a determinação do valor genético do genótipo (valor médio da progênie). Entretanto, o uso de genitores parcialmente endogâmicos em cruzamentos, pode reduzir a variação dentro das progênies e melhorar a determinação do valor genético dos genitores (dos genitores) (CEBALLOS et al., 2016). A exploração dos efeitos da endogamia também pode contribuir para melhor aproveitamento dos efeitos da heterose/vigor híbrido por meio cruzamento entre linhagens endogâmicas, semelhantemente ao relatado para a cultura do milho, que se tornou a cultura referência no uso de linhagens endogâmicas para cruzamento visando obter híbridos com alta produtividade (DUVIC, 2005).

A introdução da endogamia como uma estratégia para exploração de características recessivas e vigor híbrido é relativamente recente nos programas de melhoramento da mandioca. Essa nova abordagem tem contribuído para que novos progressos sejam obtidos com a introdução de material endogâmicos ou parcialmente endogâmicos (CEBALLOS et al., 2015). Estudos recentes foram desenvolvidos utilizando a autofecundação como estratégia para o estudo da endogamia na mandioca e por meio destes foram observados que progênies S_1 apresentam uma ampla variabilidade para diversas características agrônômicas, sendo possível a identificação de indivíduos transgressivos em relação aos parentais não endogâmicos (FREITAS, et al., 2016; KAWUKI, et al., 2011). A seleção de indivíduos transgressivos tem permitido ganhos de seleção para produtividade de raízes, parte aérea e amido (FREITAS et al., 2016; KAWUKI et al., 2011).

Também tem sido reportado que o aumento da endogamia possibilita a expressão de genes recessivos de interesse para a indústria de alimentos, como

é o caso do gene *waxy*, que produz um amido ceroso com níveis de amilose próximos a zero (CEBALLOS et al., 2007). Esse tipo de amido apresenta uma sinérese menor que o amido comum (SANCHEZ et al., 2010), além de possuir maior clareza de pasta e estabilidade de géis, que são de grande interesse para as indústrias de papel, têxtil e alimentícia (RAEMAKERS et al., 2005). Por meio da endogamia, também é possível obter maior resistência a doenças, pois segundo Keweesi et al. (2016), a autofecundação possibilitou a obtenção de indivíduos S_1 de mandioca com maior resistência a doenças como o CBSV (*Cassava Brown Streak Virus*). Todavia, existe uma preocupação na introdução da endogamia em espécies alógamas, pois a mesma favorece à ocorrência da depressão por endogamia (ABDELAZIZ et al., 2014), caracterizada como a perda de vigor, fertilidade e produtividade por meio de cruzamento entre indivíduos aparentados (CHARLESWORTH; WILLIS, 2009).

Na mandioca alguns estudos já relataram a existência de depressão por endogamia para algumas características agrônômicas, como produtividade de raízes, índice de colheita e produtividade de amido (ROJAS et al., 2009; KAWUKI et al., 2011; FREITAS et al., 2016). Entretanto, esses trabalhos mostraram que cada progênie apresenta um comportamento diferente sobre os efeitos da depressão por endogamia em uma determinada característica e que, portanto, é possível selecionar clones transgressivos com melhor performance agrônômica.

Mesmo que uma cultura apresente níveis significativos de depressão por endogamia, isso não impossibilita a exploração de linhagens endogâmicas, a exemplo do que acontece na cultura do milho, em que mesmo apresentando elevada depressão por endogamia para algumas características (PACHECO et al., 2002; GARCIA et al., 2004; AHMAD et al. 2010), este fenômeno não tem comprometido a exploração da endogamia para aumento da produtividade de grãos (DUVICK, 2005). Segundo Rojas et al. (2009), existem muitas semelhanças entre os efeitos da depressão por endogamia observados na cultura da mandioca e milho, e portanto, é esperado que a depressão por endogamia na mandioca tenha a mesma viabilidade técnica da cultura do milho.

Seleção assistida por marcadores moleculares visando aumento da endogamia

A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) consiste na seleção de indivíduos em uma população com base em informações moleculares do DNA. Essa técnica é muito útil, pois permite a seleção precoce, rápida e eficiente dos indivíduos promissores dentro de um programa de melhoramento (IDREES; IRSHAD, 2014). A SAM apresenta vários benefícios quando associada aos métodos convencionais de melhoramento, tais como a redução dos custos no melhoramento, no avanço de gerações e na eficiência de seleção (XU; CROUCH, 2008). A grande vantagem da utilização da SAM em relação aos métodos convencionais é a diminuição de tempo para a obtenção do genótipo desejado, visto que a mesma permite a seleção de indivíduos nas fases iniciais de desenvolvimento e o descarte precoce de indivíduos que não são de interesse (MORRIS et al., 2003).

Essa técnica tem sido utilizada para diversas finalidades, tais como retrocruzamentos, mapeamento e rastreamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*), estudos de heterose, piramidação de genes, dentre outros (COLLARD; MACKILL, 2007). A SAM também pode ser utilizada para estudos de endogamia auxiliando na identificação de indivíduos com maior nível de homozigose em populações segregantes (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

O desenvolvimento de ferramentas da biologia molecular, tais como marcadores moleculares, têm auxiliado os programas de melhoramento convencional de plantas para melhorar eficiência na seleção e condução das populações segregantes (KORDROSTAMI; RAHIMI, 2015). Atualmente existem vários tipos de marcadores moleculares, sendo os mais comuns os ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*) (SCHULMAN, 2007). Dentre os vários tipos de marcadores, os microssatélites (SSR) são os mais adequados para estudos de endogamia por causa do seu alto nível de polimorfismo, alta reprodutibilidade e natureza codominante e multialélica. Esses também tem sido amplamente utilizados em outros estudos como, por exemplo, teste de paternidade, conservação de recursos genéticos, estrutura de população, diversidade genética (OLIVEIRA et al., 2006) e na seleção assistida por marcadores moleculares (KAUR et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

A utilização da SAM em populações segregantes para a obtenção de linhagens endogâmicas, tem como objetivo quantificar a endogamia dos indivíduos dentro de progênies, permitindo a seleção dos indivíduos mais endogâmicos para uso em novos ciclos de autofecundação, reduzindo significativamente o tempo e os custos necessários para a obtenção de linhas puras (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al. 2012).

Características gerais do amido

O amido é um importante constituinte na dieta humana, sendo uma das principais fontes de carboidratos e energia por estar presente em diversos alimentos ou fazer parte da constituição da maioria dos produtos alimentícios (COUTINHO; CABELLO, 2005). Além da alimentação humana, o amido possui diversas aplicações na indústria de papel, farmacêutica e ração animal (SANTANA; MEIRELLES, 2014). As principais fontes de amido são o milho, trigo, arroz, batata e mandioca (JOBLING, 2004). Embora essas fontes convencionais de amido tenham características distintas que determinam o uso e aplicação do amido, muitas vezes estes amidos passam por processos físico-químicos que alteram suas propriedades, ou os convertem em outros produtos como maltodextrinas e glicose (MITIDIARI et al., 2006; SODHI et al., 2005).

Tendo em vista a grande aplicabilidade e uso do amido, existe uma tendência dos diversos setores industriais na procura por amidos nativos com características especiais como tamanho, relação amilose/amilopectina, propriedades de gelatinização dentre outras, que possam substituir os amidos modificados ou facilitar os processos de modificação (LEONEL, 2007; VASCONCELOS et al., 2017).

Apesar da necessidade de se desenvolver novas fontes de amido, pouca informação está disponível sobre a viabilidade do uso de novos amidos com características específicas e a aplicabilidade prática de fontes não convencionais de amido. Assim, é necessário que esses amidos sejam estudados para entendimento dos parâmetros estruturais e funcionais que possam propiciar redução dos custos da matéria-prima nas indústrias e ainda aumentar a competitividade na indústria para atendimento da demanda crescente, tanto no mercado nacional, quanto internacional (SANTANA; MEIRELES, 2014).

O amido é a principal forma de armazenamento de energia das plantas por longos períodos de tempo. O grânulo de amido é bem adaptado a essa função, pois o mesmo é insolúvel em água à temperatura ambiente, mas é susceptível a enzimas catabólicas presentes nas plantas. Os grânulos são encontrados em diversas partes da planta, principalmente em sementes, raízes e tubérculos, mas também podem ser encontrados em hastes, frutos e folhas (PÉREZ et al., 2009).

O grânulo de amido é um polissacarídeo constituído principalmente por duas moléculas, a amilose e a amilopectina, que representam aproximadamente 98% a 99% do peso seco do grânulo (BREUNINGER et al., 2009). Esses polímeros possuem estrutura básica muito semelhante, diferindo principalmente no comprimento e grau de ramificação das moléculas, que resultam em alterações significativas nas suas propriedades físico-químicas (SANTANA; MEIRELLES, 2014). A amilose é um polímero essencialmente linear formado por ligações α -(1-4) entre unidades de α -D-glicopiranosose. Todavia, podem possuir ligações α -(1,6) de até 2% (SANTANA; MEIRELLES, 2014). Essas moléculas tendem a formar estruturas helicoidais, existindo evidências de que a amilose apresenta-se com uma dupla hélice em solução e que pode existir nesse estado nos grânulos de amido (WHISTLER; DANIEL, 1993).

A amilopectina é essencialmente ramificada, formada por unidades de α -D-glicopiranosose por ligações α -(1-4) e 6% de ligações α -(1-6) (SANTANA; MEIRELLES, 2014). As suas moléculas de amido desenvolvem-se a partir de uma única unidade de α -D-glicopiranosose e as outras unidades de D-glicopiranosil são adicionadas sequencialmente (WHISTLER; DANIEL, 1993). As estruturas químicas da amilose e amilopectina, encontram-se na Figura 1.

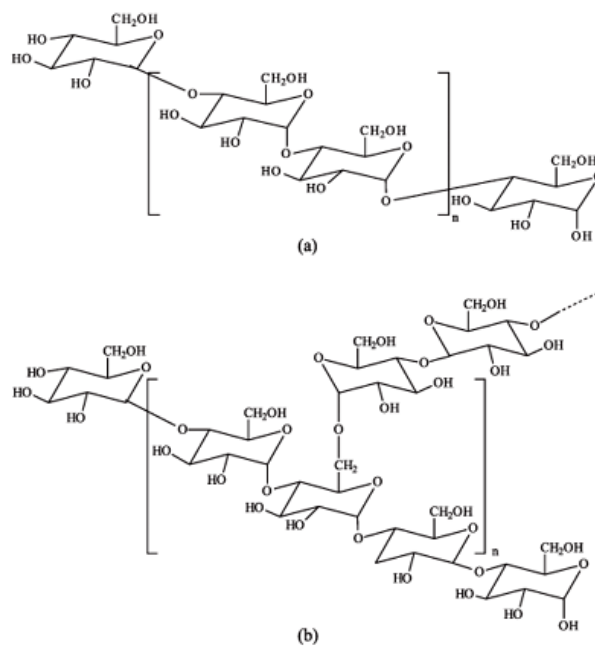


Figura 1: Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b). Fonte: Corradine et al. (2005).

Os grânulos de amido apresentam diversas formas podendo ser esféricos, poligonais, plaquetados, em forma de túbulos irregulares, dentre outras. As dimensões no comprimento também podem variar de 0,1 a 200 μm a depender da espécie (PÉREZ et al., 2009). Na mandioca, os grânulos de amido possuem formatos circular, oval e truncado (circular com uma superfície plana em um lado) e variam no tamanho, de 4 a 40 μm (CEBALLOS et al., 2007). O tamanho do grânulo de amido também é uma característica muito importante, visto que diferenças no tamanho do grânulo podem influenciar nas propriedades físico-químicas do amido, tais como propriedades de pasta, gelatinização, susceptibilidade enzimática, solubilidade e relação amilose/amilopectina (LINDEBOOM et al., 2004).

Para a indústria de alimentos, o amido de mandioca apresenta algumas vantagens em relação aos amidos obtidos de cereais, considerando o sabor característico de cereais, que é um aspecto indesejado para aplicações alimentícias, pois pode alterar o sabor do produto final que possui amido na sua composição. Todavia, por possuir baixos teores de lipídeos, o amido de mandioca não apresenta sabor forte e não compromete o sabor dos produtos que o utilizam como ingrediente básico (BREUNINGER et al., 2009). Outros fatores importantes que favorecem o amido de mandioca em relação ao de cereais para aplicações na

indústria de alimento e outros setores, é o seu comportamento físico-químico durante o processo de cozimento em solução aquosa, que resulta em pastas com elevada claridade e viscosidade (CHE et al., 2007). Além disso, o amido de mandioca apresenta baixa temperatura de gelatinização e baixa tendência de retrogração, quando comparado ao amido de cereais (DEMIATE; KOTOVICZ, 2011).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZIZ, M.; MUÑOZ-AJARES, A. J.; BERBEL, M.; PERFECTTI, F.; GÓMEZ, J. M. Association between inbreeding depression and floral traits in a generalist-pollinated plant. **Journal of evolutionary biology**, v. 27, p. 2495-2506, 2014.

AHMAD, M.; KHAN, S.; AHMAD, F.; SHAH, N. H.; AKHTAR, N. Evaluation of 99 S₁ lines of maize for inbreeding depression. **Pakistan Journal of Agricultural Science**, v. 47, p. 209-213, 2010.

ALBUQUERQUE, J. D. A. A.; SEDIYAMA, T.; ALVES, J. M. A.; SILVA, A. A.; UCHÔA, S. C. P. Cultivo de mandioca e feijão em sistemas consorciados realizado em Coimbra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 532-538, 2012.

BREUNINGER, W. F.; PIYACHOMKWAN, K.; SRIROTH, K. Tapioca/Cassava: production and use. **Starch: Chemistry and Technology**, v.3, p.541-568, 2009.

CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C.A.; PÉREZ, J.C.; DIXON, A.G.O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant molecular biology**, v. 56, p. 503-516, 2004.

CEBALLOS, H.; KAWUKI, R.S.; GRACEN, V.E.; YENCHO, G.C.; HERSHEY, C.H. Conventional breeding, marker-assisted selection, genomic selection and inbreeding in clonally propagated crops: a case study for cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 1647-1667, 2015.

CEBALLOS, H.; KULAKOW, P.; HERSHEY, C. Cassava breeding: current status, bottlenecks and the potential of biotechnology tools. **Tropical plant biology**, v. 5, p. 73-87, 2012.

CEBALLOS, H.; PÉREZ, J.C.; BARANDICA, O.J.; LENIS, J.I.; MORANTE, N.; CALLE, F.; PINTO, L.; HERSHEY, C.H. Cassava Breeding I: the value of breeding value. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; MORANTE, N.; FREGENE, M.; DUFOUR, D.; SMITH, A. M.; MESTRES, C. Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7469-7476, 2007.

CHARLESWORTH, D; WILLIS, J. H. The genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 783-796, 2009.

CHE, L. M.; LI, D.; WANG, L. J.; DONG CHEN, X.; MAO, Z. H. Micronization and hydrophobic modification of cassava starch. **International Journal of Food Properties**, v. 10, p. 527-536, 2007.

CHETTY, C. C.; ROSSIN, C. B.; GRUISSEM, W.; VANDERSCHUREN, H.; REY, M. E. C. Empowering biotechnology in southern Africa: establishment of a robust transformation platform for the production of transgenic industry-preferred cassava. **New biotechnology**, v. 30, p. 136-143, 2013.

COLLARD, B. C.Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, p. 557-572, 2008.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 268-273, 2005.

COUTINHO, A. P. C.; CABELLO, C. Caracterização reológica da fécula de mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 1, p. 40-48, 2005.

DEMIATE, I. M.; KOTOVICZ, V. Cassava starch in the Brazilian food industry. **Food Science and Technology**, v. 31, p. 388-397, 2011.

DUVICK, D. N. Genetic progress in yield of United States maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, v. 50, p. 193-202, 2005.

ECHEBIRI, R. N.; EDABA, M. E. I. Production and utilization of cassava in Nigeria: prospects for food security and infant nutrition. **Production Agriculture and Technology**, v. 4, p. 38-52, 2008.

ELIAS, M.; PENET, L.; VINDRY, P.; MCKEY, D.; PANAUD, O.; ROBERT, T. Unmanaged sexual reproduction and the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in a traditional farming system. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1895-1907, 2001.

EL-SHARKAWY, M. A.; COCK, J. H.; PORTO, M. C. M. Características fotossintéticas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, p.143-154, 1989.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acesso em: Dez. 2016.

FREITAS, J. P. X.; SILVAS, V. S.; OLIVEIRA, E. J. Inbreeding depression in cassava for productive traits. **Euphytica**, v. 209, p.137-154, 2016.

FUKUDA, W.M.G.; IGLESIAS, C. Recursos genéticos. In:_____ **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. 1 ed. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 301-323.

GARCÍA, P.; SAN VICENTE, F.; QUIJADA, P.; BEJARANO, A. Depresión por endocría en poblaciones tropicales de maíz antes y después de la selección recurrente de familias de hermanos completos. **Bioagro**, v. 16, p. 17-25, 2004.

GUIRA, F.; SOME, K.; KABORE, D.; SAWADOG-LINGANI, H.; TRAORE, Y.; SAVADOGO, A. Origins, production, and utilization of cassava in Burkina Faso, a contribution of a neglected crop to household food security. **Food Science & Nutrition**, v.4, p. 1-9, 2016.

HALSEY, M.; OLSEN, K.M.; TAYLOR, N.J.; AGUIRRE, P.C. Reproductive biology of cassava (Crantz) and isolation of experimental field trials. **Crop Science**, v. 48, p. 49-58, 2008.

IDREES, M.; IRSHAD, M. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: A review. **European Academic Research**, v. 2, p. 1513-1540, 2014.

JOBLING, Steve. Improving starch for food and industrial applications. **Current opinion in plant biology**, v. 7, p. 210-218, 2004.

KAUR, S.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; KAUR, V. Simple sequence repeat markers in genetic divergence and marker-assisted selection of rice cultivars: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, p. 41-49, 2015.

KAWEESI, T.; KYALIGONZA, V.; BAGUMA, Y.; KAWUKI, R.; MORAG, F. Inbreeding enhances field resistance to cassava brown streak viruses. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v.8, p.138-149, 2016.

KAWUKI, R. S.; NUWAMANYA, E.; LABUSCHAGNE, M. T.; HERSELMAN, L.; FERGUSON M. E. Segregation of selected agronomic traits in six S₁ cassava families. **Journal Plant Breeding Crop Science**, v.3, p.154-160, 2011.

KORDROSTAMI. M.; RAHIMI. M. Molecular markers in plants: concepts and applications. **Genetics in the 3rd millennium**, v. 13, p. 4024-4031, 2015.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.579-588, 2007.

LINDEBOOM, NIENKE; CHANG, PETER R.; TYLER, ROBERT T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch-Stärke**, v. 56, p. 89-99, 2004.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource technology**, v. 97, p. 1217-1224, 2006.

MORRIS, M.; DREHER, K.; RIBAUT, J.M.; KHAIRALLAH, M. Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, v. 11, p. 235-247, 2003.

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.

OLIVEIRA, E.J.; OLIVEIRA, G.A.F.; COSTA, J.L.; OLIVEIRA, V.J.S.; DANTAS, A.C.V.L.; DANTAS, J.L.L.; PÁDUA, J.G. Genetic diversity and marker-assisted inbreeding in papaya. **Scientia Horticulturae**, v. 147, p. 20-28, 2012.

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

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 517-526, 2004.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. **American journal of botany**, v. 88, n. 1, p. 131-142, 2001.

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

PACHECO, C. A. P.; SANTOS, M. X. D.; CRUZ, C. D.; PARENTONI, S. N.; GUIMARÃES, P. E. D. O.; SILVA, Á. E. D.; VIEIRA JÚNIOR, P. A. Inbreeding depression of 28 maize elite open pollinated varieties. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 441-448, 2002.

PÉREZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Structural features of starch granules I. **Starch: Chemistry and technology**, v. 3, p.149-192, 2009.

RAEMAKERS, K.; SCHREUDER, M.; SUURS, L.; FURRER-VERHORST, H.; VINCKEN, J.P.; DE VETTEN, N.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G. Improved cassava starch by antisense inhibition of granule-bound starch synthase I. **Molecular Breeding**, V.16, p.163-172, 2005.

RAMU, P.; ESUMA, W.; KAWUKI, R.; RABBI, I. Y.; EGESI, C.; BREDESON, J. V.; LU, F. Cassava haplotype map highlights fixation of deleterious mutations during clonal propagation. **Nature Genetics**, v.49, p.959-963, 2017.

ROJAS, M. C.; PÉREZ, J. C.; CEBALLOS, H.; BAENA, D.; MORANTE, N.; CALLE, F. Analysis of inbreeding depression in eight S₁ cassava families. **Crop Science**, v.49, p.543-548, 2009.

SAGRILO, E.; VIDIGAL FILHO, P. S.; PEQUENO, M. G.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KVITSCHAL, M. V. Dry matter production and distribution in three cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars during the second vegetative plant

cycle. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1079-1087, 2008.

SÁNCHEZ, T.; DUFOUR, D.; MORENO, I.X; CEBALLOS, H. Comparison of pasting and gel stabilities of waxy and normal starches from potato, maize, and rice with those of a novel waxy cassava starch under thermal, chemical, and mechanical stress. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 5093-5099, 2010.

SANTANA, A. L.; MEIRELES, M. A. A. New starches are the trend for industry applications: a review. **Food and Public Health**, v. 4, p. 229-241, 2014.

SCHULMAN, A. H. Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica**, v. 158, p. 313-321, 2007.

SODHI, H. K.; SHARMA, K.; GUPTA, J. K.; SONI, S. K. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 525-534, 2005.

SOUZA, A. P.; MASSENBURG, L. N.; JAISWAL, D.; CHENG, S.; SHEKAR, R.; LONG, S. P. Rooting for cassava: insights into photosynthesis and associated physiology as a route to improve yield potential. **New Phytologist**, v. 213, p. 50-65, 2017.

TONUKARI, N. J.; TONUKARI, N. J.; EZEDOM, T.; ENUMA, C. C.; SAKPA, S. O.; AVWIOROKO, O. J.; ODIYOMA, E. White gold: cassava as an industrial base. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 972, 2015.

VASCONCELOS, L. M.; BRITO, A. C.; CARMO, C. D.; OLIVEIRA, P. H. G. A.; OLIVEIRA, E.J. Phenotypic diversity of starch granules in cassava germplasm. **Genetics and molecular research**, v. 16, p. 1-15, 2017.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Carbohidratos. In:_____. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 81-156.

XU. Y.; CROUCH, J. H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Science**, v. 48, p. 391-407, 2008.

CAPÍTULO 1

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA AUMENTO DA ENDOGAMIA EM POPULAÇÕES S₁ DE MANDIOCA

SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA AUMENTO DA ENDOGAMIA EM POPULAÇÕES S₁ DE MANDIOCA

RESUMO: A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é uma técnica útil na seleção precoce de genótipos desejáveis. Este trabalho teve como objetivo utilizar a SAM em progênies autofecundadas de mandioca para a obtenção de indivíduos com maior endogamia (f) visando à rápida obtenção de linhagens de mandioca. Três progênies (F0222, F1378 e F1662) foram autofecundadas gerando um total de 274 indivíduos S₁. As progênies e os indivíduos S₁ foram avaliados nas fases de *seedlings* e avaliação clonal (CET). No CET, as plantas foram avaliadas para: altura de planta (AP), teor de matéria seca nas raízes (MS), produtividade da parte aérea (PPA), produtividade de raízes (PTR) e de amido (PAM). Para determinar o nível de endogamia dos indivíduos S₁ foram utilizados 27 iniciadores microssatélites e cinco iniciadores minissatélites. Foram identificados indivíduos com valores de f variando de 0,11 a 0,89 dentro de uma mesma progênie. Também foi observado que a maioria dos indivíduos S₁ apresentaram f acima de 0,50. Por meio da SAM foram selecionados em média, 25% dos indivíduos S₁, proporcionando um aumento médio de 38% na endogamia nas progênies. Por outro lado, a seleção fenotípica não apresentou diferenças significativas. Além disso, observou-se que não houve correlação entre o nível de endogamia e as características agronômicas avaliadas. A SAM foi bastante eficiente na identificação e seleção de indivíduos S₁ de mandioca com maior endogamia, contribuindo para a redução nos ciclos de melhoramento para obtenção de linhagens endogâmicas.

Palavras chaves: *Manihot esculenta* Crantz; autofecundação; linhagens de mandioca; microssatélites.

MARKER ASSISTED SELECTION FOR INCREASING INBREEDING IN S₁ POPULATIONS OF CASSAVA

ABSTRACT: Marker assisted selection (MAS) is a very useful technique for early selection of desirable genotypes. The objective of the present work was to use MAS in self-fertilized cassavas for obtaining individuals with high inbreeding (f) values aiming rapid obtainment of cassava lines. Three progenies (F0222, F1378 and F1662) were self-fertilized generating a total of 272 S₁ individuals. The progenies and the S₁ individuals were evaluated in the seedlings and clonal phases (CP). In the CP, plants were evaluated for the following characteristics: plant height (PH), root dry matter content (DM), productivity of aerial part (PAP), productivity of roots (PR) and starch (PS). Twenty-seven microsatellite and five minisatellite primers were used to determine the level of inbreeding of the S₁ individuals. Inbreeding (f) values varied from 0.11 to 0.89 in the same progeny, whereas most of the S₁ individuals presented f values above 0.50. 25% of the S₁ individuals selected via MAS provided an average increase of 38% of inbreeding in the progenies. In contrast, phenotypic selection did not present any significant differences. Furthermore, there was no correlation between the level of inbreeding and the agronomic characteristics evaluated. MAS was very efficient in the identification and selection of cassava S₁ individuals with higher inbreeding values contributing to the decrease in the breeding cycles for obtainment of cassava inbred lines.

Key words: cassava lines; *Manihot esculenta* Crantz; microsatellites; self-fertilization.

INTRODUÇÃO

A cultura da mandioca é uma das principais fontes de carboidratos para milhões de pessoas, principalmente na África, Ásia e América Latina, sendo considerada a segunda fonte de amido mais importante do mundo, ficando atrás apenas do milho (CEBALLOS et al., 2015). A produção da mandioca está também fortemente ligada à agricultura familiar em países em desenvolvimento (HALSEY et al., 2008), porém possui um grande potencial industrial (OLIVEIRA et al., 2012a), devido às diversas aplicações como em produtos farmacêuticos, indústria têxtil, cosmética, petróleo, álcool, celulose, alimentícia e de papel, dentre outras (SAENGCHAN, et al., 2015).

Cultivares de mandioca para uso industrial devem conter características específicas, sobretudo elevada produtividade de raiz e teor de matéria seca, bem como resistência a doenças. Os programas de melhoramento da mandioca têm buscado desenvolver novas cultivares para atender essas demandas da indústria (CEBALLOS et al., 2004), porém, mesmo havendo grande demanda do mercado, poucos genótipos melhorados estão disponíveis para atender à demanda crescente por variedades de alta performance agronômica.

Possivelmente isso ocorre em função do relativo curto período de domesticação da espécie para uso em lavouras comerciais em larga escala, bem como aos mais diversos intemperes ambientais ao qual a cultura é submetida, o que faz com que haja seleção de variedades adaptadas a ambientes ou características específicas. A tarefa de reunir diferentes características em uma única variedade, fica sob responsabilidade dos melhoristas. Contudo, os programas de melhoramento de mandioca são relativamente recentes (sobretudo década de 60), e embora existam relatos de incrementos na produtividade de raízes, é constante a demanda pelo desenvolvimento de novas variedades cada vez mais produtivas e com características diferenciais de amido.

No âmbito dos programas de melhoramento, uma alternativa para o desenvolvimento de cultivares com maior produtividade, é a exploração da heterose (vigor híbrido), por meio do cruzamento entre linhagens endogâmicas (PRADO et al., 2013). Essa estratégia tem sido empregada com sucesso há muitos anos na cultura do milho (LI et al., 2014) e recentemente tem sido empregada em espécies autógamas (GOFF et al., 2013) e espécies com melhoramento genético relativamente recente como o mamoeiro (MARIN et al.,

2006). Mesmo se tratando de espécies completamente distintas, os resultados mostram o aumento significativo da produtividade dos híbridos obtidos nessas culturas. Por outro lado, na cultura da mandioca, a exploração da heterose não tem sido explorada de forma rotineira, sobretudo pelo fato de haver pouco investimento na produção de linhagens endogâmicas (CEBALLOS et al., 2012).

Um dos principais métodos de melhoramento utilizado para conduzir populações segregantes derivadas do cruzamento entre genótipos elites altamente heterozigotos, é a seleção recorrente recíproca fenotípica, que permite explorar a heterose de forma efetiva (CEBALLOS et al., 2004; CEBALLOS et al., 2012). Por outro lado, a exploração dos efeitos da heterose (efeitos não aditivos) sem o uso de linhagens endogâmicas classificadas em diferentes grupos heteróticos, pode ser bastante lenta (CEBALLOS et al., 2015), por isso esforços devem ser empenhados para o desenvolvimento de linhagens endogâmicas de forma a explorar os efeitos de dominância que são prevalentes em diversas características produtivas em mandioca, a exemplo de rendimento de raízes e índice de colheita (WOLF et al., 2016).

A autofecundação já vem sendo empregada como uma estratégia para a obtenção de populações segregantes com o objetivo final de desenvolver linhagens endogâmicas na cultura da mandioca (FREITAS et al., 2016; ROJAS et al., 2009). No entanto, fatores como a elevada heterozigosidade da cultura, que resulta em progênes com alta taxa de segregação, dificuldades no florescimento e o longo ciclo da cultura, também dificultam a obtenção de materiais endogâmicos (CEBALLOS et al., 2017; HALSEY et al., 2008). De acordo com Oliveira et al. (2010) os métodos convencionais de melhoramento baseados na seleção fenotípica em populações segregantes para caracterização de linhagens endogâmicas são dispendiosos, necessitam de muito tempo e espaço, além de serem influenciados por fatores ambientais.

Outra abordagem para desenvolvimento de linhagens endogâmicas seria a indução de haploides e posteriores duplicações cromossômicas por meio da tecnologia de duplos haploides. Entretanto, os protocolos para obtenção de haploides em mandioca são limitados e pouco eficientes para a geração de um grande número de indivíduos normais (PERERA et al., 2014). Nesse sentido, uma estratégia viável para melhorar a eficiência no processo de seleção de indivíduos homozigóticos seria a utilização de ferramentas biotecnológicas integradas aos

métodos convencionais de melhoramento, como por exemplo, os marcadores moleculares.

Dentre os diversos tipos de marcadores de DNA, os microssatélites (*Simple Sequence Repeats* - SSR) são especialmente importantes por serem codominantes, multialélicos, possuírem elevado polimorfismo e alta reprodutibilidade (OLIVEIRA et al., 2006), o que os tornam adequados para inferências sobre parentesco e endogamia. Os SSRs tem sido os mais utilizados na cultura da mandioca, sobretudo para análise de diversidade genética (FREGENE et al., 2003), teste de paternidade (MOHAN et al., 2013), e seleção assistida por marcadores (SAM) (LOKKO et al., 2005).

A SAM tem sido utilizada no melhoramento de plantas com o objetivo de selecionar genótipos com características desejadas diretamente em nível de DNA (IDREES; IRSHAD, 2014). Essa técnica apresenta vários benefícios quando associada aos métodos convencionais de melhoramento, tais como diminuição de gastos, avanço de gerações, eficiência de seleção, dentre outros (XU; CROUCH, 2008). A grande vantagem da utilização da SAM em relação aos métodos convencionais, é a diminuição de tempo para a obtenção do genótipo desejado, visto que a mesma permite a seleção de indivíduos nas fases iniciais de desenvolvimento e o descarte precoce de genótipos que não são de interesse (MORRIS et al., 2003). Essa técnica tem sido utilizada para diversas finalidades, como retrocruzamentos assistidos, mapeamento de QTLs (*quantitative trait loci*), estudos de heterose, dentre outros (COLLARD; MACKILL, 2008; KOBAYASHI et al., 2013). Também pode ser utilizada na identificação de indivíduos com maior nível de homozigose em populações segregantes (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012b).

A utilização da SAM em populações segregantes para a obtenção de linhagens endogâmicas, tem como objetivo quantificar a endogamia dos indivíduos dentro de progênies e selecionar os mais endogâmicos para novos ciclos de autofecundação (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012b). No entanto, os estudos sobre SAM visando a obtenção de linhagens endogâmicas são escassos para a cultura da mandioca. Assim, este é um estudo inovador sobre a identificação de indivíduos com maior nível de endogamia em populações segregantes de mandioca via SAM, bem como sua associação com atributos

agronômicos, com a finalidade de reduzir o número de gerações de autofecundação para a obtenção de linhagens endogâmicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de progênies autofecundadas

Para a obtenção das populações segregantes S_1 , foram selecionados como progenitores (S_0) três acessos de mandioca, BGM0222, BGM1378 e BGM1662, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de mandioca (BAG de mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas-BA. Para cada acesso, as autofecundações foram realizadas artificialmente e controladas no campo experimental da Embrapa, no ano de 2014. Após a maturação dos frutos, estes foram coletados e armazenados em sacos de papel para conservação das sementes. As sementes S_1 de cada acesso foram colocadas para germinar em tubos plásticos contendo substrato comercial, fibra de coco e vermiculita na proporção de 2:1:1, sendo mantidas em casa de vegetação. Aos 50 dias após o plantio, as plantas foram transplantadas para o campo ao atingirem tamanho médio de 30 cm, sem a utilização de delineamento experimental na fase denominada de *seedlings*.

Na fase de *seedlings*, o número de indivíduos S_1 avaliados para as progênies F1662, F0222 e F1378, foi 82, 91 e 101, respectivamente. O experimento foi instalado na área experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em Cruz das Almas-BA, situada a 12°66'17" de Latitude e 39°08'28" de Longitude, no ano de 2014. Aos 12 meses após o plantio, as plantas foram selecionadas e colhidas individualmente para o estabelecimento do ensaio de avaliação clonal (CET). O critério adotado para selecionar os indivíduos para compor o CET foi a capacidade das plantas de produzirem, no mínimo, cinco manivas com 20 cm de comprimento cada.

O CET foi instalado na área experimental da Bahiamido, em Santo Antônio de Jesus-BA situada a 13°10'56" de Latitude Sul e 39°25'30" de Longitude Oeste. Um total de 233 indivíduos foram selecionados da fase de *seedlings*, sendo 76, 78 e 79 das progênies, F1662, F0222 e F1378. Os indivíduos S_1 , juntamente com os progenitores S_0 , foram avaliados em delineamento de blocos aumentados, com os indivíduos distribuídos em 4 blocos, e com parcelas constituídas por 5 plantas. O

espaçamento utilizado foi de 0,8 m entre plantas e 0,9 m entre linhas. Os tratos culturais seguiram a recomendação de Souza et al. (2006).

Extração de DNA

Foram coletadas amostras de tecido foliar jovem do terço superior das plantas dos três progenitores e dos indivíduos S₁. As amostras de folhas coletadas foram devidamente identificadas e armazenadas em ultra freezer a -80°C. Em seguida, o DNA genômico foi extraído de folhas jovens, utilizando método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações. A avaliação da qualidade e quantidade do DNA foi realizada em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio. A quantificação do DNA foi estimada por comparação da intensidade da banda com as alíquotas de quantidades padrão de concentração conhecida (DNA Lambda-Sigma). As amostras foram diluídas em Tris-EDTA (TE) e padronizadas em 10 ng μL^{-1} .

Amplificação dos marcadores micro e minissatélites

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15 μL , contendo 30 ng de DNA genômico, 0,2mM de primer (IDT), 1 U de TaqDNA Polimerase (PLUTHERO, 1993), 2 mM de MgCl_2 , 0,2mM de dNTP e 1X de Tris KCl (Promega, USA). As amplificações foram realizadas em termociclador Veritti® 96-well (Applied Biosystems) nas seguintes condições: uma desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 29 ciclos de desnaturação a 94°C por minuto, anelamento específico para cada primer por 60s a 72°C por minuto (Tabela 1), e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. A eletroforese dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose 3% (Invitrogen) a 120 v, durante 4 horas, corado com brometo de etídeo (0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$), em tampão TBE 0,5X. Os fragmentos foram visualizados sob luz UV e fotografados com o sistema de foto documentação Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging, New Haven, USA). Em seguida, os fragmentos foram analisados em comparação com um marcador de tamanho de par de bases conhecido (DNA ladder 100pb) (Fermentas) para a determinação do tamanho das bandas amplificadas.

Determinação de polimorfismo dos iniciadores

Inicialmente foram testados 55 iniciadores microssatélites (série SSRY e EME) e seis minissatélites para estudo da endogamia em indivíduos S₁ de mandioca. Os microssatélites e minissatélites foram previamente amplificados nos progenitores F0222, F1378 e F1662. Os iniciadores que revelaram heterozigose nos progenitores com bom padrão de amplificação e ausência de bandas inespecíficas, foram selecionados para serem amplificados em todos os indivíduos S₁.

Após a seleção dos iniciadores, foram utilizados um total de 27 locos microssatélites (SSRY e EME) e cinco minissatélites (VNTR), sendo identificados 16 microssatélites polimórficos para a progênie F1662, e 18 microssatélites para as progênies F0222 e F1378 (Tabela 1).

Avaliações agronômicas

Para o ensaio clonal, aos 12 meses após o plantio, foi realizada a colheita e a avaliação dos caracteres agronômicos. Para isso, as cinco plantas de cada parcela foram utilizadas, sendo mensurados os seguintes caracteres: altura de planta (AP - mensurada em metros); produtividade de parte aérea (PPA - mensurado em t ha⁻¹); produtividade total de raízes (PTR - mensurado em t ha⁻¹); produtividade de amido (PAM - mensurado em t ha⁻¹); e teor de matéria seca (MS - mensurado em % utilizando balança hidrostática, de acordo com KAWANO et al., 1987).

Análises dos dados

As análises moleculares dos dados foram realizadas com o auxílio do *software* Powermarker 3.25 (LIU; MUSE, 2005) para determinar a heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (*f*), em todos os indivíduos S₁ das três progênies de mandioca. O coeficiente de endogamia foi determinado seguindo o método proposto por Wright

et al. (1965) no qual $f = 1 - \frac{H_o}{H_e}$.

1 **Tabela 1.** Relação de marcadores microssatélites (SSRY e EME) e minissatélites (VNTR) utilizados para avaliação da endogamia
2 em indivíduos S₁ de mandioca oriundos da autofecundação dos acessos BGM0222 (F0222), BGM1378 (F1378) e BGM1662
3 (F1662).

Locus	Motivo	Forward	Reverse	Pb	Ta ^o	Marcadores por família S ₁		
						F0222	F1378	F1662
SSRY101	(gct) ₁₃	ggagaataaccaccgacagga	acagcagcaatcaccatttc	213	55		X	
SSRY103	(ga) ₂₂	tgagaaggaaactgctgcac	cagcaagaccatcaccagttt	272	55		X	X
SSRY105	(gt) ₆ gc(gt) ₂ (ga) ₁₆	caaacatctgcactttggc	tcgagtggcttctggtcttc	225	55	X		
SSRY106	(ct) ₂₄	ggaaactgctgcacaaaga	cagcaagaccatcaccagttt	270	55		X	X
SSRY13	(ct) ₂₉	gcaagaattccaccaggaag	caatgatggtaagatggtgcag	234	55	X		
SSRY143	(ga) ₁₂	gctcatgaactgagcctca	agcagatccaaatcactgaaa	153	55	X		
SSRY165	(gt) ₁₇ (ga) ₁₈	aatgagttgcaaaggccaa	ggtaaacaaatgatgtggtgctc	243	55			X
SSRY168	(ga) ₈ (n) ₄ (ga)aga(n) ₂₁₁	acagccacactgttctcca	ctgcaatctccaacagcaac	277	45	X	X	
SSRY170	(ta) ₅ (n) ₇₁ (ct) ₂₄	tctcgattggttggttca	tcatcctgttgacgctta	299	55	X		X
SSRY175	(ga) ₃₈	tgactagcagacacggtttca	gctaacagtccaataacgataagg	136	55		X	
SSRY179	(ga) ₂₈	caggctcaggtgaagtaaagg	gcgaaagtaagtctacaacttttctaa	226	55	X	X	X
SSRY182	(ca) ₁₇ (n) ₃₁ gagg(ga) ₈	ggaattcttgcttatgatgcc	ttcctttacaattctggacgc	253	55		X	
SSRY28	(ct) ₂₆ (at) ₃ ac(at) ₂	ttgacatgagtgatattttcttgag	gctgcgtgcaaaactaaaat	180	55		X	
SSRY30	(ct) ₂₂	ccatccactagaaactttaaagca	caactcagcggagcttttc	220	55		X	
SSRY49	(ga) ₂₅	tgaaaatctcactggcattattt	tgcaaccatagtccaagc	300	55	X	X	X
SSRY68	(ct) ₁₂ cc(ct) ₁₇	gctgcagaatttgaagatgg	cagctggaggaccaaaaatg	287	55		X	X
SSRY8	(ca) ₁₄ ct(ca) ₂	agtggtttgagaagactggtga	tttccaaaatggaactcaaaa	288	45	X		X
SSRY81	(ga) ₂₂	ggcgatttcatgcatgctt	tgattttctgcgtgatgagc	204	55	X		
SSRY82	(ga) ₂₄	tgtgacaatttccagatagcttca	caccatcggcattaaactttg	211	55			X

4 **Tabela 1. Cont...**

Locus	Motivo	Forward	Reverse	pb	Ta°C	Marcadores por família S ₁		
						F0222	F1378	F1662
SSRY83	(gt) ₂₂ ct(gt) ₂	tggctagatggtgattattgctt	tgcttactctttgattccacg	239	55	X		
SSRY93	(ct) ₂₅	tttgttgctcacatgaaaacg	cagatttcttggtgctg	289	55			X
SSRY94	(ca) ₂₃ tc(ca) ₃ (ct) ₃ (n) ₉	aggatggacttgagatgga	ggtggaagtaaggctgttagtg	268	55		X	X
EME189	catggt ₅	cagagcacatccagaaattgtt	gaaatagatcaagtgcccatc	180	60	X	X	
EME205	gat+taa ₆	ccagagcgtataactggaac	tcaggagtggtgatggtt	250	55	X		X
EME260	at ₁₄	gttggagttgtagttgctgc	catgggcttgaaaaatgaact	160	58	X	X	X
EME395	tatggc ₆	tcaaaggtatcggggaggtag	gttaccctactaacatcgcat	200	58	X	X	
EME425	tc ₇ +tggaat ₃	cctccacaacctatcaatca	cggtagccatagccataaca	140	55			X
VNTR4	tgcttc _(23,5)	aatcatatcaggggctggtg	cgagggaaatgctgacctt	220	58°	X	X	
VNTR5	catctt _(23,2)	ttgctccaatctctcaca	gatcaaaacgggcttgaat	233	58°		X	X
VNTR71	aaatgccagtaaggccacgagtctg aatctcag ₍₁₅₎	tgagataaactccaaaagtaagaa	gcttcatggtgaggctctt	589	60°	X	X	X
VNTR72	tgagaagagacagagagaagctcgt gaaagagaagaaaa ₍₁₆₎	gcttaggcgggaagaaaatg	tgttcaactgcctctctttgc	828	58°	X		
VNTR90	atgaacagagccctaagtctccaaatg ttacccttatgggtaacccaa ₍₁₄₎	gaaccgtgaacagtaaccgata	cccggctgttcaataaaat	835	60°	X		

5 pb: Tamanho de pares de bases; Ta: Temperatura de anelamento do primer; X: primer selecionado para análise de endogamia em toda progênie.

Para os dados fenotípicos dos caracteres agrônômicos, foi realizada a análise de acordo com o modelo linear misto, referente à avaliação sob o delineamento de blocos aumentados (RESENDE, 2007). A análise foi realizada considerando o seguinte modelo: $y = Xf + Zg + Wb + e$, sendo: y - vetor dos dados; f - vetor dos efeitos assumidos como fixo (médias das testemunhas e média dos indivíduos); g - vetor dos efeitos genotípicos dos indivíduos (aleatórios); b - vetor dos efeitos ambientais de blocos (aleatórios); e - vetor dos resíduos (aleatórios). As matrizes de incidência dos efeitos aleatórios estão representadas pelas letras maiúsculas.

A partir dos valores genéticos (*Best Linear Unbiased Prediction* - BLUP) e dos valores do coeficiente de endogamia dos indivíduos, estimou-se a correlação de Pearson, utilizando o pacote "corrgram" no software R (R Development, Core Team, 2017). A seleção dos indivíduos S_1 com base nos BLUPs das características fenotípicas, foi realizada com uso do seguinte índice de seleção (IS): $IS=(AP*5)+(PPA*5)+(PTR*10)+(PAM*10)+(MS*10)$.

RESULTADOS

Parâmetros genéticos e análise de endogamia dos indivíduos S_1

A distribuição dos coeficientes de endogamia (f) foi bastante semelhante entre as três progênies analisadas. A maior proporção dos indivíduos S_1 apresentou f entre 0,40 a 0,60, representando 50%, 56% e 41% do total de indivíduos das progênies F0222, F1378 e F1662, respectivamente (Figura 1). A distribuição dos indivíduos S_1 com f variando entre 0,60 e 0,79, que consiste em indivíduos com elevada endogamia, foi de 24% (F0222), 20% (F1378) e 27% (F1662). Por outro lado, apenas 1,25% dos indivíduos nas progênies F0222 e F1378, apresentaram estimativa de f acima de 0,80.

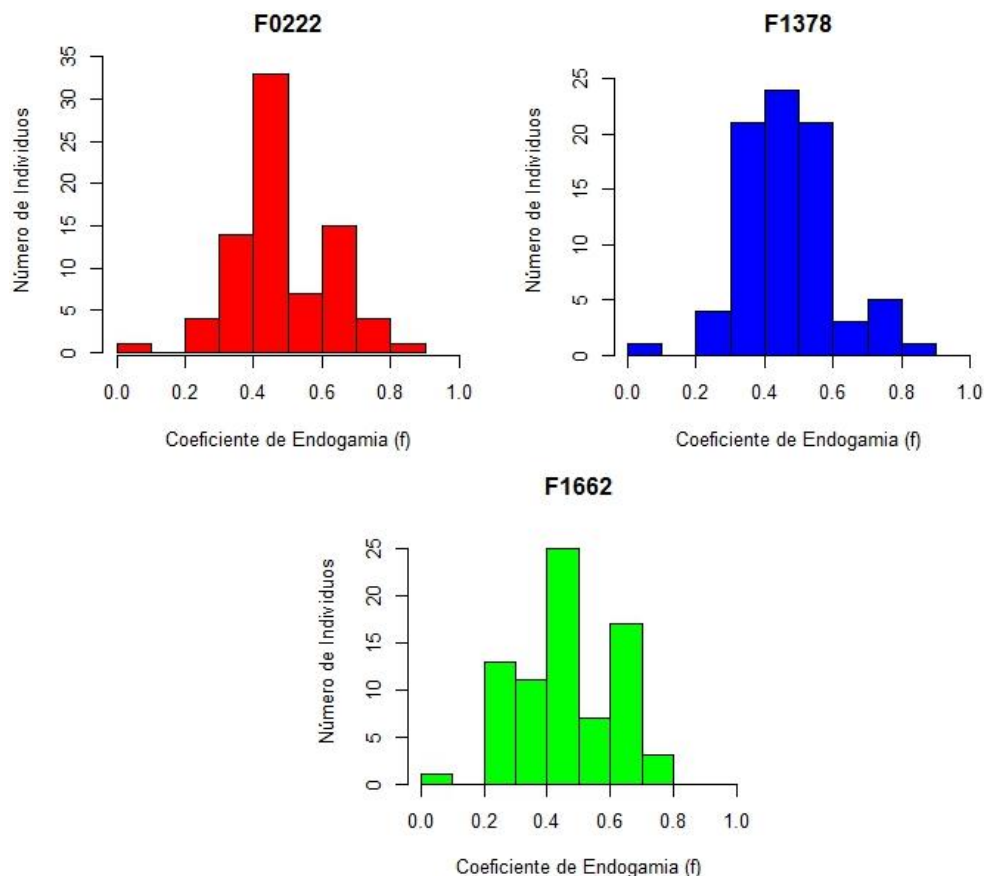


Figura 2: Distribuição do coeficiente de endogamia (f) nos indivíduos S_1 de mandioca oriundos da autofecundação dos acessos BGM0222 (F0222), BGM1378 (F1378) e BGM1662 (F1662).

A heterozigosidade observada (H_o) dos indivíduos S_1 para as três progênes analisadas apresentou distribuição bastante semelhante ao coeficiente de endogamia, possivelmente pelo fato de ser um componente importante no cálculo do f . Cerca de 50%, 45% e 41% do total de indivíduos nas progênes F0222, F1378 e F1662, respectivamente, apresentaram concentração de indivíduos com H_o entre 0,40 a 0,60 (Figura 2). A distribuição de indivíduos com elevada H_o ($> 0,60$) variou de 24 a 32% nas progênes F0222 e F1378, respectivamente. Por outro lado, os menores valores de H_o foram de 0,17, 0,11 e 0,25 em indivíduos S_1 das progênes F0222, F1378 e F1662, respectivamente (Tabela 2).

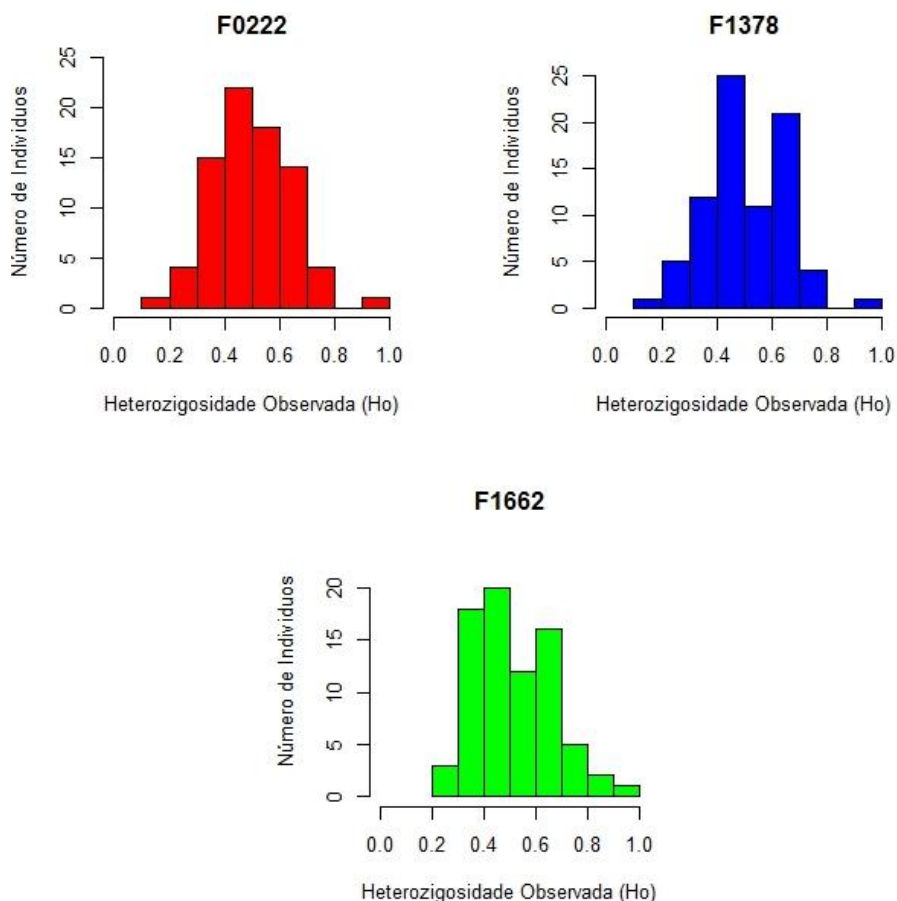


Figura 2: Distribuição da heterozigosidade observada (H_o) nos indivíduos S_1 de mandioca oriundos da autofecundação dos acessos BGM0222 (F0222), BGM1378 (F1378) e BGM1662 (F1662).

Tabela 2: Estimativas dos valores mínimos, máximos e médias da heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (f), obtida pela análise de indivíduos S_1 de mandioca de diferentes progênes.

Progênie	Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média
F0222	H_o	0,17	1,00	0,50
	F	0	0,83	0,48
F1378	Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média
	H_o	0,11	1,00	0,51
F1662	F	0,00	0,89	0,49
	Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média
F1662	H_o	0,25	1,00	0,51
	F	0,00	0,74	0,49

Em relação às análises de He e Ho nos locos microssatélites, houve variação muito pequena nos valores de He em todas as progênes (0,46 a 0,50 e média de 0,49), enquanto que a variação de Ho foi mais ampla (0,35 a 0,67) (Tabela 3). Os menores valores de Ho foram observados para os marcadores SSR83 (F0222), VNTR71 (F1378) e SSR170 (F1662) (0,35, 0,37 e 0,38, respectivamente), enquanto que os locos com maior Ho foram o SSR08 (0,61) na progênie F0222; bem como SSR103, SSR106, SSR168, SSR175, SSR28, SSR49 e VNTR05 (0,60 a 0,65) na progênie F1378 e SSR93 (0,57) na progênie F1662. Embora a progênie F1378 tenha apresentado maior número de locos com Ho acima de 0,60, as médias de Ho foram semelhantes entre as progênes, ou seja, 0,51 (F0222) 0,54 (F1378) e 0,52 (F1662).

Tabela 3. Estimativas de heterozigosidade esperada (He) e heterozigosidade observada (Ho) em locos microssatélites avaliados em indivíduos S₁ de mandioca oriundos da autofecundação dos acessos BGM0222 (F0222), BGM1378 (F1378) e BGM1662 (F1662).

F0222				F1378				F1662			
Iniciador	Ho	He	Cr	Iniciador	Ho	He	Cr	Iniciador	Ho	He	Cr
EME189	0,54	0,49	9	EME189	0,56	0,50	9	EME205	0,56	0,50	1
EME205	0,49	0,50	1	EME260	0,50	0,48	11	EME260	0,51	0,49	11
EME260	0,51	0,50	11	EME395	0,56	0,49	6	EME425	0,57	0,49	5
EME395	0,54	0,50	6	SSR101	0,49	0,49	7	SSR103	0,47	0,49	12
SSR08	0,61	0,50	3	SSR103	0,60	0,50	12	SSR106	0,47	0,49	12
SSR105	0,44	0,50	14	SSR106	0,62	0,49	12	SSR165	0,55	0,50	13
SSR13	0,53	0,50	2	SSR168	0,63	0,50	6	SSR170	0,38	0,49	14
SSR143	0,51	0,50	11	SSR175	0,65	0,49	3	SSR179	0,51	0,49	4
SSR170	0,48	0,50	14	SSR179	0,44	0,50	4	SSR49	0,58	0,50	2
SSR179	0,56	0,50	4	SSR182	0,51	0,48	9	SSR68	0,57	0,50	4
SSR49	0,57	0,50	2	SSR28	0,61	0,50	12	SSR8	0,56	0,50	3
SSR68	0,56	0,49	4	SSR30	0,49	0,48	13	SSR82	0,49	0,49	5
SSR81	0,56	0,46	5	SSR49	0,65	0,50	2	SSR93	0,57	0,49	3
SSR83	0,35	0,50	12	SSR68	0,44	0,50	4	SSR94	0,53	0,50	11
VNRT04	0,52	0,49	11	SSR94	0,56	0,49	11	VNTR05	0,51	0,49	10
VNRT71	0,51	0,50	15	VNTR04	0,43	0,48	11	VNTR71	0,52	0,50	15
VNTR72	0,54	0,50	1	VNTR05	0,62	0,50	10				
VNTR90	0,49	0,50	11	VNTR71	0,37	0,47	15				
Média	0,51	0,49		Média	0,54	0,49		Média	0,52	0,49	

Cr: localização cromossômica dos mini e microssatélites.

Considerando a localização cromossômica dos marcadores mini e microsatélites, observou-se que de modo geral, a distribuição da endogamia e H_o foram mais similares na F1662 (f e H_o variando de 0,40 a 0,62 e 0,38 a 0,60, respectivamente), em comparação com as demais famílias (Figura 3). Por outro lado, a variação dos parâmetros existentes na F0222 ($f = 0,39$ a 0,65 e $H_o = 0,35$ a 0,61, respectivamente) e F1378 ($f = 0,36$ a 0,63 e $H_o = 0,37$ a 0,64, respectivamente), não foi tão elevada a ponto de levantar a hipótese de desigualdade na homoziguidade nos diferentes cromossomos. Embora tenha sido utilizado um reduzido número de marcadores moleculares, os resultados indicam que a genotipagem com os mini e microsatélites foi bem distribuída nos diferentes cromossomos da mandioca (11 dos 18 cromossomos de *M. esculenta*), o que contribui para uma melhor cobertura do nível de homoziguidade no genoma da espécie.

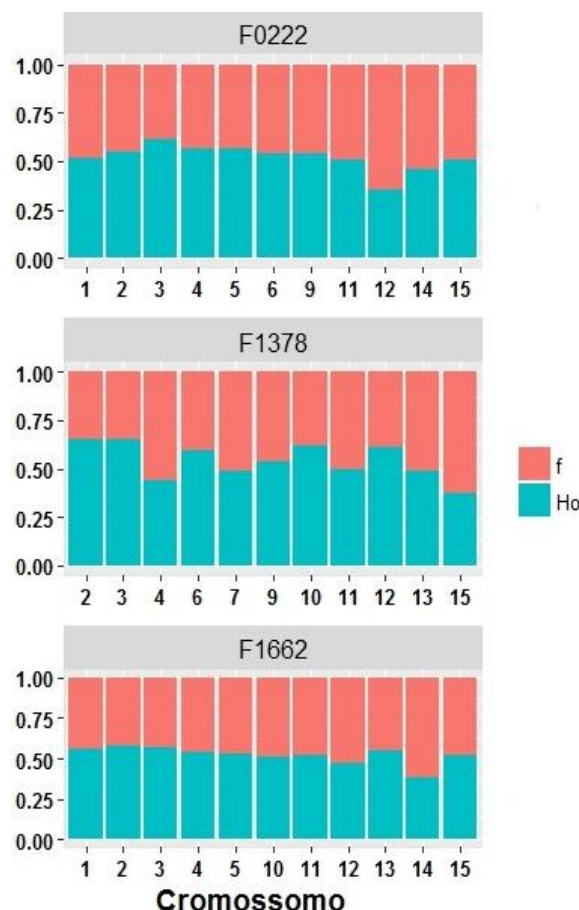


Figura 3: Distribuição da heteroziguidade observada (H_o) e endogamia (f) em indivíduos S_1 de mandioca oriundos da autofecundação dos acessos BGM0222 (F0222), BGM1378 (F1378) e BGM1662 (F1662), considerando a localização cromossômica dos marcadores moleculares utilizados na genotipagem.

Análise da endogamia e desempenho agrônômico baseado em diferentes critérios de seleção

Considerando as informações genótípicas dos marcadores moleculares, indivíduos S_1 com maior nível de endogamia dentro de cada progênie ($f \geq 0,60$) foram identificados e selecionados para os próximos ciclos de autofecundação. Neste caso, a intensidade de seleção aplicada foi 25%, 21% e 27% nas famílias F0222, F1378 e F1662, sendo possível selecionar 20, 17 e 21 indivíduos S_1 , respectivamente, com maior endogamia.

A comparação entre as médias das características agrônômicas avaliadas (altura de planta; produtividade da parte aérea, raízes e amido; e teor de matéria seca na raiz), considerando os indivíduos S_1 selecionados com base no coeficiente de endogamia ($f \geq 0,60$) e indivíduos não selecionados com base neste critério, revelou que não houve diferença expressiva nas médias destas características para a maioria dos caracteres avaliados, exceto para produtividade da parte aérea na progênie F1378, em que o grupo de indivíduos selecionados pelo f apresentou maior média (Figura 4). Portanto, é possível realizar a seleção de indivíduos em progênies S_1 de mandioca com maior endogamia, sem que haja perdas expressivas no desempenho agrônômico. Por outro lado, como todo processo seletivo, a seleção dos indivíduos S_1 com maior coeficiente de endogamia resultou em redução da variação fenotípica para as características altura de planta (F1378 e F1662), produtividade da parte aérea (F0222 e F1662), produtividade de raízes e amido (F1662) (Figura 4).

Caso a seleção dos indivíduos S_1 fosse realizada com base no índice de seleção (performance agrônômica) ao invés do coeficiente de endogamia, como é feito tradicionalmente nos programas de melhoramento genético, seria observada elevação na média das características, sobretudo para teor de matéria seca (F1378 e F1662), produtividade da parte aérea e de raízes (F1378), e produtividade de amido (F0222 e F1378) (Figura 5). Neste caso, a variação para a maioria das características agrônômicas nas três progênies seria preservada, mas haveria redução na endogamia nas progênies F0222 e F1662, o que certamente contribuiria para aumento no número de autofecundações necessárias para a obtenção de linhagens endogâmicas.

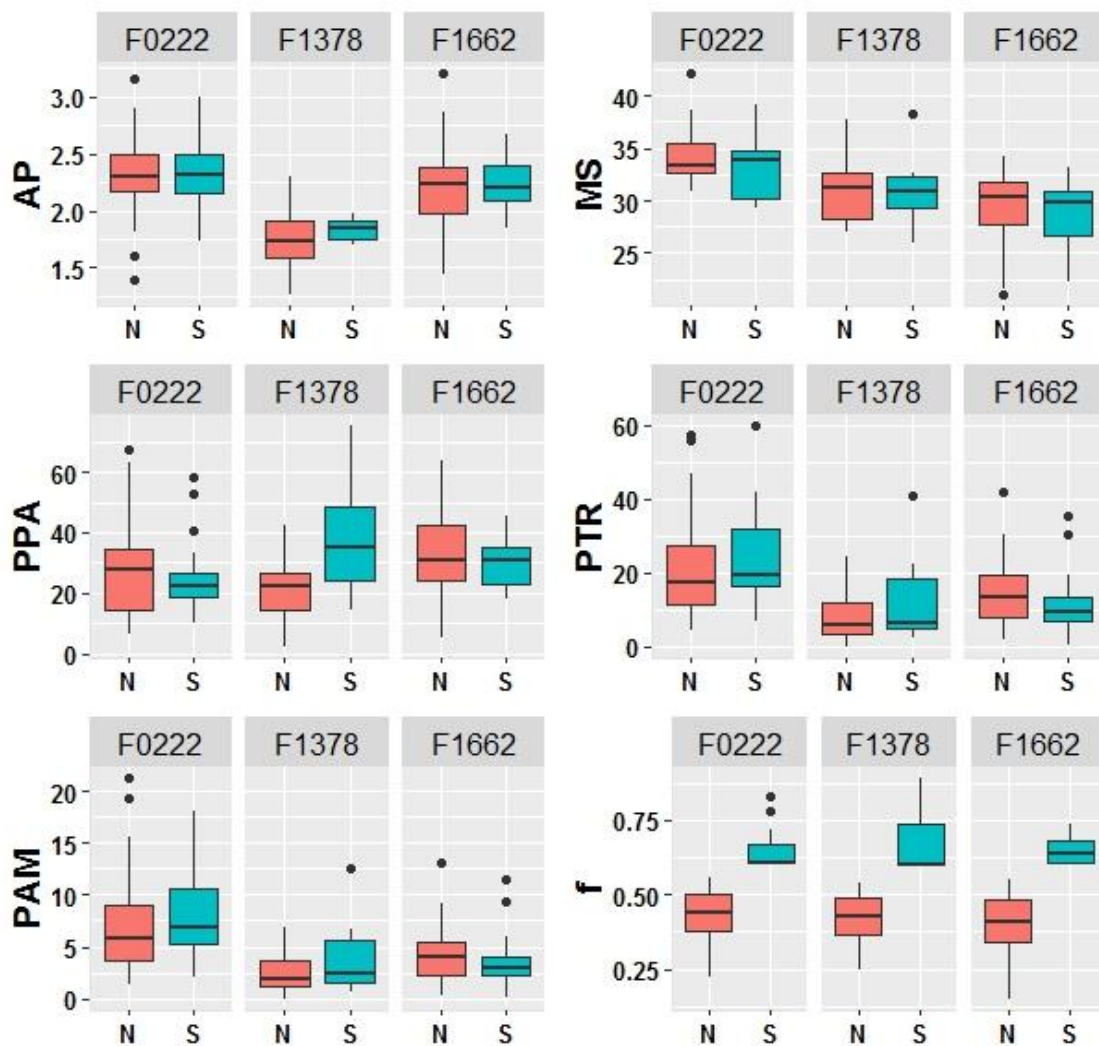


Figura 4: Boxplot da seleção de indivíduos S_1 de mandioca oriundos da autofecundação dos acessos BGM0222 (F0222), BGM1378 (F1378) e BGM1662 (F1662), com base no coeficiente de endogamia (f). N: grupo de indivíduos não selecionados com $f < 0,60$. S: grupo de indivíduos selecionados com $f \geq 0,60$. AP: altura de planta. MS: teor de matéria seca na raiz, PPA: produtividade da parte aérea, PTR: produtividade de raízes, PAM: produtividade de amido.

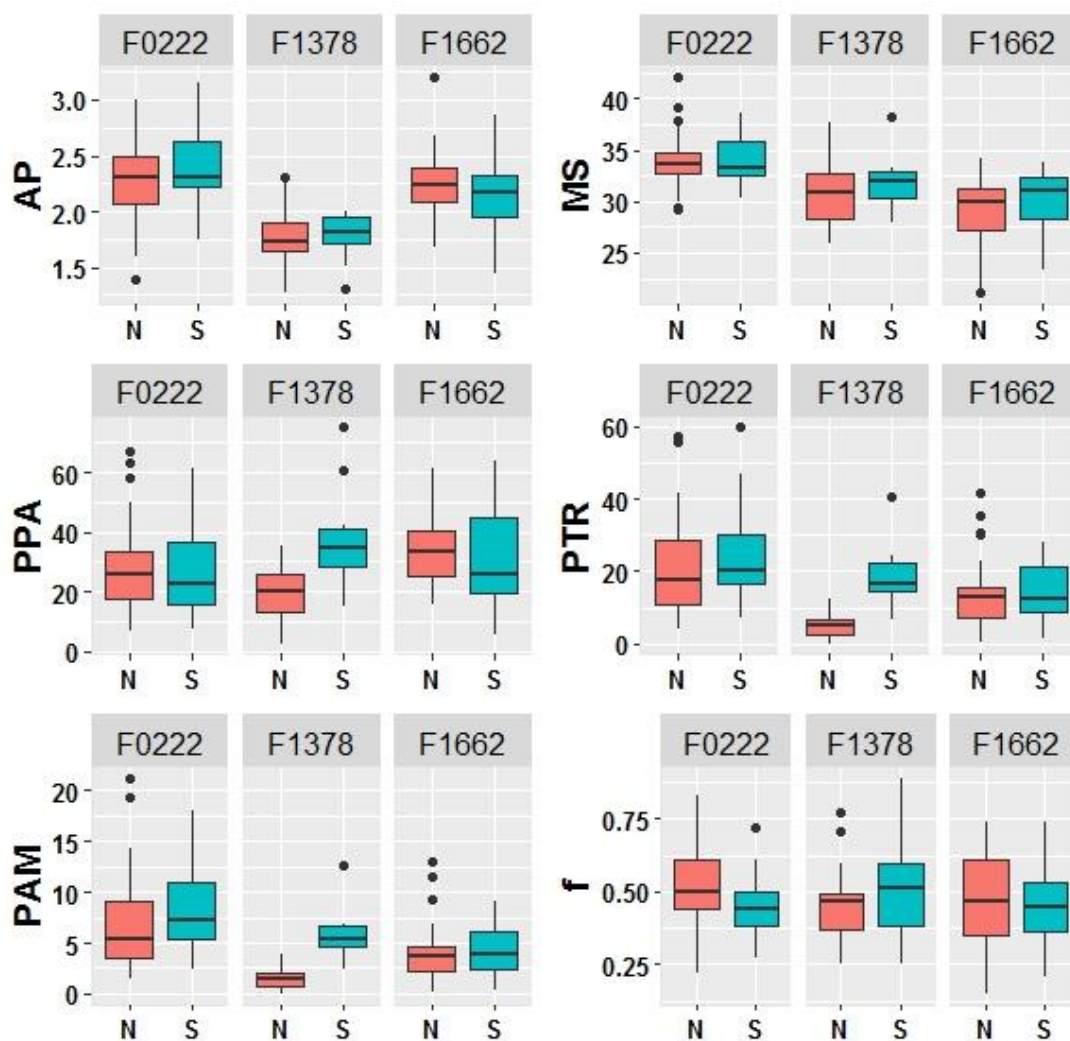


Figura 5: Boxplot da seleção de indivíduos S_1 de mandioca oriundos da autofecundação dos acessos BGM0222 (F0222), BGM1378 (F1378) e BGM1662 (F1662), com base no ranqueamento do índice de seleção $IS=(AP*5)+(PPA*5)+(PTR*10)+(PAM*10)+(MS*10)$. S e N: indivíduos S_1 selecionados e não selecionados pelo índice de seleção. AP: altura de planta. MS: teor de matéria seca na raiz, PPA: produtividade da parte aérea, PTR: produtividade de raízes, PAM: produtividade de amido, e f : coeficiente de endogamia.

Endogamia e atributos agrônômicos

Considerando a distribuição da endogamia em três grupos distintos: Grupo 1 ($0,10 < f < 0,39$), Grupo 2 ($0,40 < f < 0,59$), e Grupo 3 ($> 0,60$), observou-se maior diferença fenotípica entre as progênies S_1 em comparação com os grupos de endogamia (Figura 6). Em nenhuma progênie foi observada relação linear entre a

endogamia e a performance agronômica, pois em alguns casos, a média do Grupo 2 foi menor em comparação aos demais grupos (teor de matéria seca nas raízes, produtividade da parte aérea e de raízes – F1378), e em outros, foi maior (teor de matéria seca nas raízes, produtividade da parte aérea e de raízes na progênie F1662, e produtividade da parte aérea e de raízes na progênie F0222). Além disso, as variações das características agronômicas foram muito similares entre os diferentes grupos de endogamia, indicando ausência de associação entre o desempenho agronômico das progênies S_1 com o nível de endogamia. De fato, as estimativas da correlação genética entre f e as características agronômicas foram nulas (não diferiram de zero) (Figura 7), o que corrobora a ausência de associação entre o coeficiente de endogamia com aumento ou redução nos atributos agronômicos mensurados em indivíduos S_1 de mandioca.

Para os caracteres agronômicos, com exceção das estimativas entre AP e MS e entre PPA e MS que não diferiram de zero, as demais estimativas da correlação genética foram positivas e diferentes de zero (Figura 7). Foi observada uma forte correlação positiva entre PTR e PAM (0,99). Já para as estimativas entre PPA e PTR (0,53); PPA e PAM (0,52); AP e PPA (0,48); AP e PTR (0,30); AP e PAM (0,30); MS e PTR (0,21); MS e PAM (0,28); os valores evidenciam uma associação linear positiva, mas de magnitude moderada.

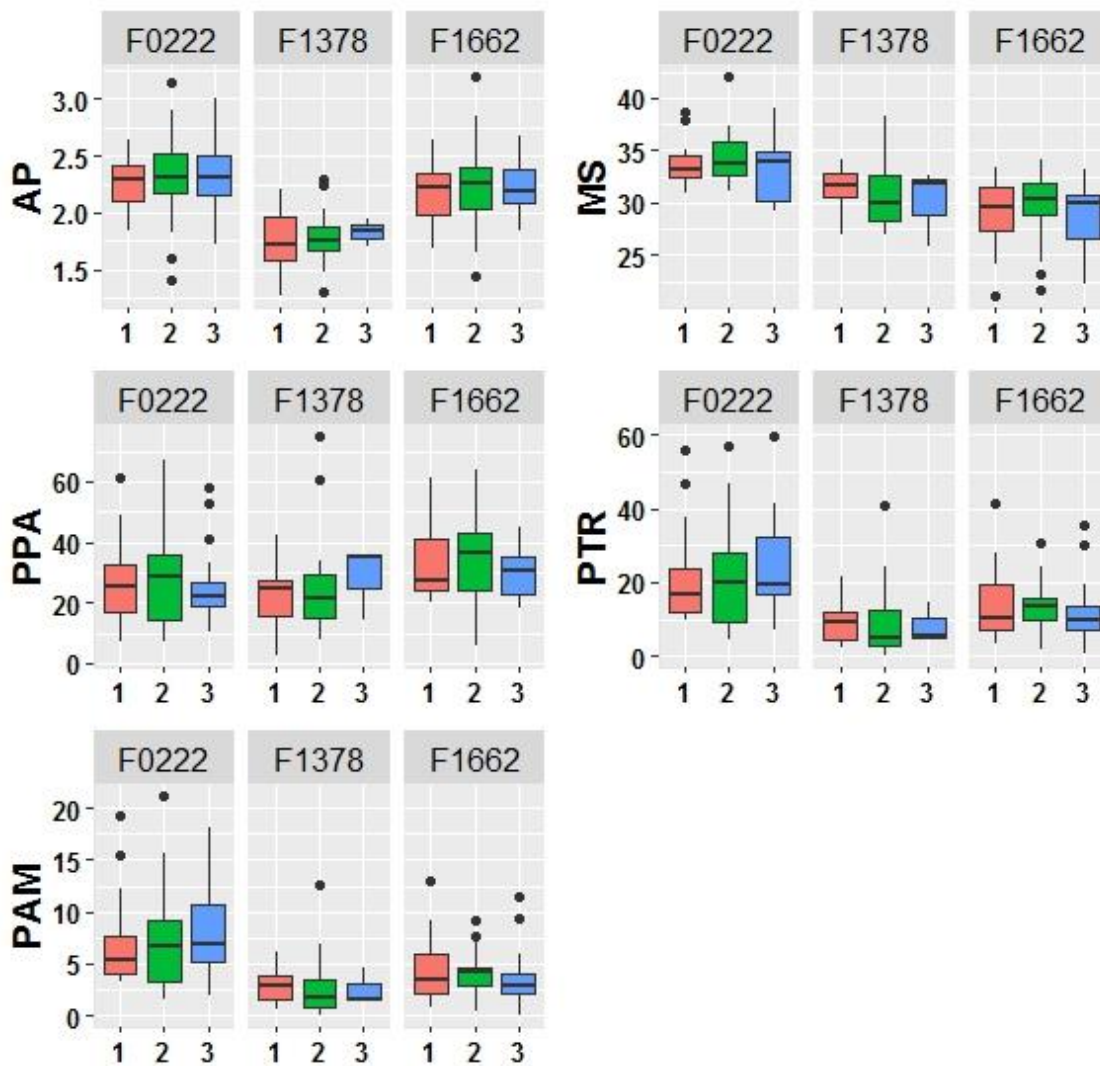


Figura 6: Boxplot do desempenho agrônômico de indivíduos S_1 de mandioca oriundos da autofecundação dos acessos BGM0222 (F0222), BGM1378 (F1378) e BGM1662 (F1662), baseado no agrupamento do coeficiente de endogamia (f). Grupo 1 ($0,10 < f < 0,39$), Grupo 2 ($0,40 < f < 0,59$), e Grupo 3 ($f > 0,60$). AP: altura de planta. MS: teor de matéria seca na raiz, PPA: produtividade da parte aérea, PTR: produtividade de raízes, PAM: produtividade de amido.

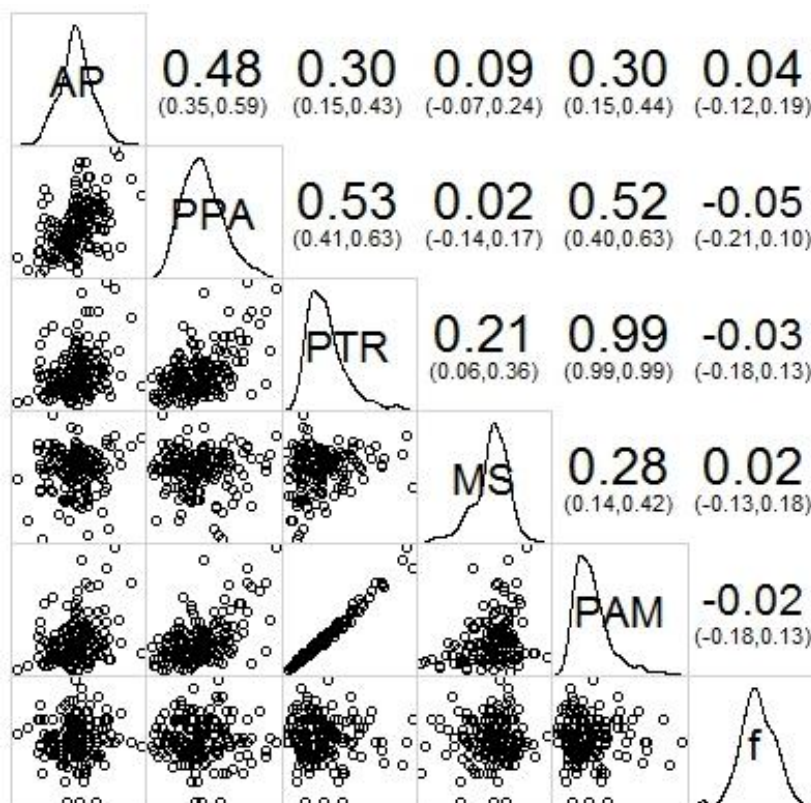


Figura 7. Estimativas da correlação de Pearson para o coeficiente de endogamia e características agronômicas de indivíduos S_1 de mandioca. AP: Altura de planta. MS: Teor de Matéria seca, PPA: Peso de parte aérea, PTR: Peso total de raiz, PAM: Produtividade de amido, e f : coeficiente de endogamia.

DISCUSSÃO

Seleção assistida por marcadores moleculares para obtenção de linhagens endogâmicas

A determinação do coeficiente de endogamia por meio da H_o e H_e , estimadas com base em diferentes locos marcadores, é uma forma eficiente de determinar a endogamia especialmente em caso de populações originadas por autofecundação, populações de irmãos completos e meio irmãos (GOUDET; KELLER, 2002). A variação do coeficiente de endogamia nas progênies S_1 de mandioca foi de 0,00 a 0,89 nas diferentes populações autofecundadas, porém, a maioria dos indivíduos S_1 , apresentou endogamia entre 0,40 e 0,60. Em média, a endogamia ficou bem próxima de 0,50 (0,48 para F0222, 0,49 para F1378 e F1662). Esses resultados estão de acordo com a redução média esperada em

50% da heterose e, por conseguinte, da heterozigosidade dos locos (Wu et al., 2016).

Considerando apenas um ciclo de autofecundação, foi possível identificar indivíduos S_1 com coeficiente de endogamia muito acima da média esperada ($f > 0,70$). Esse resultado é de fundamental importância para acelerar o desenvolvimento de linhagens de mandioca, pois mesmo utilizando um número modesto de marcadores moleculares, os resultados demonstraram a eficiência da SAM na identificação de indivíduos mais homozigóticos dentro de populações segregantes S_1 .

A utilização de SAM para obtenção de linhagens endogâmicas não é amplamente difundida, porém em algumas culturas, tem sido utilizada com sucesso, a exemplo do mamoeiro, na qual foram identificados indivíduos com f variando entre 0,60 até 1,00 em diversos genótipos do banco de germoplasma oriundos de cruzamentos entre progênies em gerações avançadas de endogamia (S_3 , S_4 e F_4) (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012b). Em outro trabalho na cultura da mamoneira, Machado et al. (2016) relataram endogamia variando entre 0,25 a 0,75 em indivíduos de progênies F_4 de mamoneira, indicando a possibilidade de aplicação da SAM pra seleção de indivíduos transgressivos em diferentes espécies e populações de melhoramento. Esta seleção precoce dos indivíduos mais endogâmicos certamente trará impactos positivos na redução no tempo necessário para o desenvolvimento destas linhagens quando comparado apenas com a seleção fenotípica praticada no melhoramento convencional.

Apesar dos esforços e investimentos empregados no desenvolvimento de marcadores moleculares para estabelecimento da SAM de forma eficiente no melhoramento da mandioca, poucos resultados práticos como ferramenta auxiliar de seleção tem sido relatados (OLIVEIRA et al., 2012a). Por outro lado, alguns exemplos de sucesso no uso da SAM no melhoramento da mandioca referem-se à introdução do gene de resistência ao CMD (*Cassava Mosaic Disease*) no germoplasma africano, utilizando fontes de resistência provenientes da América Latina (OKOGBENIN et al., 2007). Em outras culturas como o arroz, a implementação da SAM tem contribuído para aumento no ganho genético em relação aos métodos fenotípicos, pois reduziu em média 40% dos custos para desenvolvimento de genótipos superiores resistentes a ferrugem (Kuchel et al., 2005). Adicionalmente, Morris et al. (2003) concluíram que a SAM não apresentou

redução efetiva de custo em comparação com métodos convencionais de seleção na cultura do milho, porém foi mais eficiente na redução do tempo necessário para obtenção de linhagens endogâmicas.

A seleção baseada nos dados fenótipos não resultou em diferenças expressivas na média dos indivíduos selecionados e não selecionados para a maioria das características, exceto para PPA e PAM na progênie F0222 e PPA, PTR e PAM na progênie F1378. Por outro lado, a seleção baseada nos indivíduos com $f \geq 0,60$ proporcionou um aumento médio de aproximadamente 38% na endogamia média das progênies avaliadas, sem afetar o desempenho agrônomo dos indivíduos selecionados. Portanto, os resultados obtidos via SAM podem contribuir sobremaneira para seleção de indivíduos mais homozigóticos para compor a geração S_2 , e ainda resultar em ganhos genéticos, quando acompanhado das avaliações fenotípicas.

Embora o uso de linhagens endogâmicas seja um objetivo importante no melhoramento da mandioca, sua obtenção é um processo complexo, pois os métodos convencionais relacionados à autofecundação são dispendiosos, demorados e ainda podem ser influenciados por efeitos ambientais (CEBALLOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010). Com isso, o desenvolvimento de linhas puras de mandioca poderia levar em torno de 14 anos. Por outro lado, o uso da SAM pode ser bastante eficiente na identificação dos indivíduos mais homozigóticos, os quais podem ser selecionados precocemente e em seguida, rapidamente submetidos a um novo ciclo de autofecundação para gerar populações S_n , com locos fixados.

Morris et al. (2003) avaliaram o custo benefício da SAM em comparação com a seleção fenotípica para o desenvolvimento de linhagens endogâmicas de milho com introgressão de um alelo dominante por meio de retrocruzamento. Os autores verificaram que 96% do genoma do parental recorrente foi recuperado com três ciclos de retrocruzamentos assistidos por microssatélites. No entanto, para a seleção fenotípica, foram necessários seis retrocruzamentos para recuperar essa mesma proporção do genoma do parental recorrente. Portanto, a SAM possibilitou a redução de três ciclos de retrocruzamento, o que levou à economia de tempo e recursos humanos. Em outro estudo na cultura do arroz, a SAM também permitiu a obtenção de genótipos altamente homozigóticos com resistência ao alagamento, em três ciclos de retrocruzamento (BC_3F_1), enquanto

que por seleção fenotípica, isso só seria possível no quinto ciclo de retrocruzamento (BC₅F₁) (IFTEKHARUDDAULA et al., 2012). Portanto, as vantagens inerentes do uso da SAM são bastante evidentes e culturas órfãs como a mandioca, podem se beneficiar muito dessa ferramenta quando associada ao melhoramento convencional.

Efeito do aumento da endogamia nos atributos agronômicos

Não foi observada correlação entre o coeficiente de endogamia e as características agronômicas nos indivíduos S₁ de mandioca. Uma hipótese para explicar esses resultados pode ser a ausência de ligação entre os marcadores moleculares utilizados e a expressão das características agronômicas. De acordo com Balloux et al. (2004), o número de marcadores utilizados para determinar precisamente as estimativas das correlações entre desempenho agronômico e endogamia pode ser um fator limitante, pois um pequeno número de marcadores, pode ser inadequado para fornecer informações suficientes sobre a heterozigosidade no genoma inteiro. Particularmente, no caso da mandioca, a incorporação de marcadores SNPs via *genotyping-by-sequencing* (GBS) para identificação da endogamia em progênes segregantes, poderia resolver o problema da baixa cobertura genômica, pois os SNPs são amplamente distribuídos no genoma da mandioca (1 SNP para cada 121pb – POOTAKHAM et al., 2014).

A ausência de forte associação entre endogamia vs desempenho agronômico identificada pelos marcadores moleculares em mandioca, indica que é possível se obter genótipos com maior nível de endogamia sem grandes perdas no seu desempenho agronômico, embora estas informações devam ser alvo de estudos nas populações S₂. Por outro lado, alguns estudos sobre depressão por endogamia em indivíduos S₁ de mandioca tem relatado que, a depender da progênie avaliada, existem perdas significativas em alguns caracteres agronômicos, como produtividade de raízes, peso da parte aérea, índice de colheita e para o teor de matéria seca, por meio de um fenômeno conhecido como depressão por endogamia (ROJAS et al., 2009; KAWUKI et al., 2011; FREITAS et al., 2016). Entretanto, de acordo com esses mesmos autores, a autofecundação de acessos de mandioca também permite a obtenção de indivíduos transgressivos com valores fenotípicos superiores em relação aos parentais.

Em relação às características agronômicas, os resultados obtidos neste estudo mostram associações de mediana a elevada magnitude, sobretudo entre PTR x PAM, PTR x PPA, PPA x PAM, AP x PPA. Esses resultados estão de acordo com outros estudos realizados na cultura da mandioca, os quais apresentaram correlações entre diversas características agronômicas, morfológicas e bioquímicas com magnitudes e direção similares às apresentadas no presente estudo (OJULONG et al., 2008; NTAWURUHUNGA; GU et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

Perspectivas para uso da SAM e exploração da endogamia em mandioca

A maioria dos programas de melhoramento de mandioca utilizam o método da seleção recorrente fenotípica para conduzir as populações segregantes geradas a partir de cruzamentos intraespecíficos entre indivíduos heterozigotos (CEBALLOS et al., 2004), embora a utilização de indivíduos parcialmente endogâmicos também tenha sido uma alternativa para originar clones superiores (FREITAS et al., 2016). Os resultados reportados na literatura evidenciam que o ganho genético obtido pelo uso dessas estratégias para o aumento da produtividade de raízes, matéria seca e produtividade de amido, são relevantes em clones selecionados com alto potencial genético, sendo competitivos para os principais atributos agronômicos encontrados em cultivares de mandioca utilizadas pelos agricultores. Por outro lado, recentemente, a eficiência dos programas de melhoramento genético de mandioca, utilizando estratégias convencionais de melhoramento, tem sido questionada, pois de acordo com Ceballos et al. (2016), menos de 1% dos clones gerados são avaliados nos estádios finais de avaliação e recomendação para plantio. Por isso, a baixa capacidade de predição dos valores genéticos dos parentais utilizados nos cruzamentos é um fator que precisa ser superado (CEBALLOS et al., 2016). Para isso, o uso de linhagens endogâmicas tem sido apontado como uma alternativa para melhorar a predição dos valores genéticos dos indivíduos, além de permitir que as ferramentas genômicas sejam utilizadas para melhorar o ganho com a seleção.

A busca por linhagens endogâmicas de mandioca é relativamente recente nos programas de melhoramento, porém, os ganhos potenciais do seu uso têm sido debatidos na literatura (CEBALLOS et al., 2015; FREITAS et al., 2016;

KAWEESI et al., 2016). Alguns benefícios teóricos sobre o uso da endogamia em mandioca são a redução da carga genética com a eliminação de alelos deletérios das populações; a elucidação do controle genético das principais características agrônômicas; a possibilidade de uso de métodos de melhoramento intra e interpopulacional de forma prática e rápida; a definição de grupos heteróticos para melhor exploração da heterose; uso de retrocruzamentos para transmitir alelos de interesse para genótipos elites com maior facilidade, principalmente caracteres monogênicos ou controlados por genes recessivos (CEBALLOS et al., 2004).

O desenvolvimento de linhagens de mandioca poderia inclusive mudar a forma de propagação da espécie, pois a utilização de sementes provenientes de linhagens permitiria a reprodução integral do genótipo das cultivares (a exemplo do que ocorre com a propagação clonal). Neste caso, o uso de sementes para plantio poderia favorecer à redução dos patógenos, que frequentemente estão presentes nas manivas, além de permitir a avaliação inicial dos clones com repetições já nas primeiras fases de avaliação clonal, de modo a aumentar a eficiência de seleção em fases precoces de melhoramento, pois de modo geral, existe uma baixa correlação no desempenho dos clones de mandioca avaliados nos ensaios clonais e preliminares, o que prejudica diretamente a seleção de clones superiores e descarte dos indivíduos com menor potencial genético.

Além dos fatores supracitados, a obtenção de linhagens endogâmicas de mandioca irá depender da taxa de florescimento dos genótipos selecionados. Sabe-se que a seleção realizada pelos programas de melhoramento tende a avançar indivíduos que apresentem porte ereto quando se tem foco em sistemas mecanizados de plantio, pois os tratos culturais e a colheita, são facilitados, além do fato da taxa de multiplicação desses genótipos ser elevada. Isso leva à seleção de plantas que não possuem ramificação da haste, e como o florescimento é diretamente relacionado ao nível de ramificação dos clones (CEBALLOS et al., 2017), as plantas sofrem seleção negativa para florescimento. Portanto, o progresso no avanço das gerações de autofecundação para obtenção de linhagens de mandioca deve ser feito por meio da associação entre a seleção molecular (SAM) e fenotípica considerando atributos agrônômicos, e sempre que possível, levando em consideração genótipos com elevada taxa de florescimento.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o uso da SAM foi bastante eficiente na determinação do coeficiente de endogamia em indivíduos S_1 de

mandioca, cujos resultados podem ser aplicados para fixação de locos em homozigose em progênes segregantes, tornando possível a diminuição do tempo necessário para obtenção de linhagens endogâmicas de mandioca, e com isso explorar as vantagens inerentes a este tipo de população.

CONCLUSÕES

A seleção assistida por marcadores moleculares foi eficiente na identificação de indivíduos com elevada endogamia, proporcionando uma seleção de aproximadamente 25% dos indivíduos avaliados em progênes autofecundadas de mandioca. Essa identificação precoce dos indivíduos mais homozigóticos permite agilidade no avanço de gerações e redução de custo e tempo em relação à seleção convencional para o desenvolvimento de linhagens endogâmicas.

Não foi observada correlação entre o nível de endogamia e características agronômicas nas progênes autofecundadas de mandioca. Esse resultado é muito importante visto que é possível obtermos em progênes S_1 indivíduos com elevada endogamia e atributos agronômicos desejáveis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLOUX, F.; AMOS, W.; COULSON, T. Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3021-3031, 2004.

CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C.A.; PÉREZ, J.C.; DIXON, A.G.O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 503-516, 2004.

CEBALLOS, H.; JARAMILLO, J. J.; SALAZAR, S.; PINEDA, L. M.; CALLE, F.; SETTER, T. Induction of flowering in cassava through grafting. **Journal of Plant Breeding and Crop**, v.9, p. 19-29, 2017.

CEBALLOS, H.; KAWUKI, R.S.; GRACEN, V.E.; YENCHO, G.C.; HERSHEY, C.H. Conventional breeding, marker-assisted selection, genomic selection and inbreeding in clonally propagated crops: a case study for cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, p. 1647-1667, 2015.

CEBALLOS, H.; KULAKOW, P.; HERSHEY, C. Cassava breeding: current status, bottlenecks and the potential of biotechnology tools. **Tropical Plant Biology**, v. 5, p. 73-87, 2012.

CEBALLOS, H.; PÉREZ, J.C.; BARANDICA, O.J.; LENIS, J.I.; MORANTE, N.; CALLE, F.; PINTO, L.; HERSHEY, C.H. Cassava Breeding I: the value of breeding value. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

COLLARD, B. C.Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, p. 557-572, 2008.

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

FREGENE, M. A.; SUAREZ, M.; MKUMBIRA, J.; KULEMBEKA, H.; NDEDYA, E.; KULAYA, A.; DEAN, R. Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in an asexually propagated crop. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 1083-1093, 2003.

FREITAS, J. P. X.; SILVAS, V. S.; OLIVEIRA, E. J. Inbreeding depression in cassava for productive traits. **Euphytica**, v. 209, p.137-154, 2016.

GOFF, S. A.; ZHANG, Q. Heterosis in elite hybrid rice: speculation on the genetic and biochemical mechanisms. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 221-227, 2013.

GOUDET, J.; KELLER, L. The correlation between inbreeding and fitness: does allele size matter? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, p. 201-202, 2002.

GU, B.; YAO, Q.; LI, K.; CHEN, S. Change in physicochemical traits of cassava roots and starches associated with genotypes and environmental factors. **Starch-Stärke**, v. 65, p. 253-263, 2013.

HALSEY, M.; OLSEN, K.M.; TAYLOR, N.J.; AGUIRRE, P.C. Reproductive biology of *Cassava* (Crantz) and isolation of experimental field trials. **Crop science**, v. 48, p. 49-58, 2008.

IDREES, M.; IRSHAD, M. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: A review. **European Academic Research**, v. 2, p. 1513-1540, 2014.

IFTEKHARUDDAULA, K. M.; SALAM, M. A.; NEWAZ, M. A.; AHMED, H. U.; COLLARD, B. C.; SEPTININGSIH, E. M.; MACKILL, D. J. Comparison of phenotypic versus marker-assisted background selection for the SUB1 QTL during backcrossing in rice. **Breeding Science**, v. 62, p. 216-222, 2012.

KAWEESI, T.; KYALIGONZA, V.; BAGUMA, Y.; KAWUKI, R.; MORAG, F. Inbreeding enhances field resistance to cassava brown streak viruses. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v.8, p.138-149, 2016.

KAWUKI, R. S.; NUWAMANYA, E.; LABUSCHAGNE, M. T.; HERSELMAN, L.; FERGUSON M. E. Segregation of selected agronomic traits in six S₁ cassava families. **Journal Plant Breeding Crop Science**, v.3, p.154-160, 2011.

KOBAYASHI, A.; SONODA, J.; SUGIMOTO, K.; KONDO, M.; IWASAWA, N.; HAYASHI, T.; TOMITA, K.; YANO, M.; SHIMIZU, T. Detection and verification of QTLs associated with heat-induced quality decline of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines and near-isogenic lines. **Breeding Science**, v. 63, p. 339-346, 2013.

KUCHEL, H.; YE, G.; FOX, R.; JEFFERIES, S. Genetic and economic analysis of a targeted marker-assisted wheat breeding strategy. **Molecular Breeding**, v. 16, p. 67-78, 2005.

LI, Y.; LI, Y.; MA, X.; LIU, C.; LIU, Z.; TAN, X.; SUN, B.; SHI, Y.; SONG, Y.; WANG, T.; SMITH, S. Contributions of parental inbreds and heterosis to morphology and yield of single-cross maize hybrids in China. **Crop Science**, v. 54, p. 76-88, 2014.

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

LOKKO, Y.; DANQUAH, E. Y.; OFFEI, S. K.; DIXON, A. G.; GEDIL, M. A. Molecular markers associated with a new source of resistance to the cassava mosaic disease. **African Journal of Biotechnology**, v. 4,p. 873-881, 2005.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; FERNANDES, S. L.; BRASILEIRO, H. S. Variabilidade genética e homozigose em uma população F₄ de mamoneira por meio de marcadores microssatélites. **Bragantia**, v. 75, p. 307-313, 2016.

MARIN, S.L.D.; PEREIRA, M.G.; JÚNIOR AMARAL, A.T.; MARTELLETO, L.A.P.; IDE, C.D. Heterosis in papaya hybrids from partial diallel of Solo and Formosa parents. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, p. 24-29, 2006.

MOHAN, C.; SHANMUGASUNDARAM, P.; SENTHIL, N. Identification of true hybrid progenies in cassava using simple sequence repeat (SSR) markers. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 42, n. 1, p. 155-160, 2013.

MORRIS, M.; DREHER, K.; RIBAUT, J.M.; KHAIRALLAH, M. Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, v. 11, p. 235-247, 2003.

MULAMBA, N.N.; MOCK, J.J. Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, v.7, p.40-57, 1978.

NTAWURUHUNGA, P.; DIXON, A. G. Quantitative variation and interrelationship between factors influencing cassava yield. **Journal of Applied Biosciences**, v. 26, p. 1594-1602, 2010.

OJULONG, H.; LABUSCHANGNE, M. T.; FREGENE, M.; HERSELMAN, L.A. Cassava clonal evaluation trial based on a new cassava breeding scheme. **Euphytica**, v. 160, p. 119-129, 2008.

OKOGBENIN, E.; PORTO, M. C. M.; EGESI, C.; ESPINOSA, E.; SANTOS, L. G.; OSPINA, C.; MARÍN, J.; BARRERA, E.; GUITÉRREZ, J.; EKANAYAKE, I.; IGLESIAS, C.; FREGENE, M. A. Marker-assisted introgression of resistance to cassava mosaic disease into Latin American germplasm for the genetic improvement of cassava in Africa. **Crop Science**, v. 47, p. 1895-1904, 2007.

OLIVEIRA, E. J.; DOS SANTOS, P. E. F.; PIRES, A. J. V; TOLENTINO, D. C.; DA SILVA SANTOS, V. Selection of cassava varieties for biomass and protein production in semiarid areas from Bahia. **Bioscience Journal**, v. 32, p.661-669, 2016.

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.

OLIVEIRA, E. J.; RESENDE, M.D.V.; SANTOS, V.S.; FERREIRA, C.F.; OLIVEIRA, G.A.F.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA, L.A.; VILDOSO, C.I.A. Genome-wide selection in cassava. **Euphytica**, v. 187, p. 263-276, 2012a.

OLIVEIRA, E.J.; OLIVEIRA, G.A.F.; COSTA, J.L.; OLIVEIRA, V.J.S.; DANTAS, A.C.V.L.; DANTAS, J.L.L.; PÁDUA, J.G. Genetic diversity and marker-assisted inbreeding in papaya. **Scientia Horticulturae**, v. 147, p. 20-28, 2012b.

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

PERERA, P. I. P.; ORDOÑEZ, C. A.; LOPEZ-LAVALLE, L. B.; DEDICOVA, B. A milestone in the doubled haploid pathway of cassava. **Protoplasma**, v. 251, p. 233-246, 2014.

PHUTHERO, F.G. Rapid purification of high-activity Taq DNA Polymerase. **Nucleic Acids Research** v.21, p.4850-4851,1993.

POOTAKHAM, W.; SHEARMAN, J. R.; RUANG-AREERATE, P.; SONTHIROD, C.; SANGSRAKRU, D.; JOMCHAI, N.; TANGPHATSORNRUANG, S. Large-scale SNP discovery through RNA sequencing and SNP genotyping by targeted enrichment sequencing in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plos One**, v. 9, p. 1-19, 2014.

PRADO, S.A.; GANBIM, B.L.; NOVOA, A.D.; FOSTER, D.; SENIOR, M.L.; ZINSELMEIER, C.; OTEGUI, M.E.; BORRAS, L. Correlations between parental inbred lines and derived hybrid performance for grain filling traits in maize. **Crop Science**, v. 53, p. 1636-1645, 2013.

R Core Team. "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria". Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>, Acesso em: 28/04/2017

RESENDE, M.D.V. **SELEGEN-REML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 359 p.

ROJAS, M. C.; PÉREZ, J. C.; CEBALLOS, H.; BAENA, D.; MORANTE, N.; CALLE, F. Analysis of inbreeding depression in eight S₁ cassava families. **Crop Science**, v.49, p.543-548, 2009.

SAENGCHAN, K.; NOPHARATANA, M.; LERDLATTAPORN, R.; SONGKASIRI, W. Enhancement of starch-pulp separation in centrifugal-filtration process: Effects of particle size and variety of cassava root on free starch granule separation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 208-217, 2015.

SOUZA, L.S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 817 p.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, p. 395-420, 1965.

WOLFE, M. D.; KULAKOW, P.; RABBI, I. Y.; JANNINK, J. L. Marker-based estimates reveal significant non-additive effects in clonally propagated cassava (*Manihot esculenta*): implications for the prediction of total genetic value and the selection of varieties. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v.6, p.1-47, 2016.

WU, H. X.; HALLINGBÄCK, H. R.; SÁNCHEZ, L. Performance of seven tree breeding strategies under conditions of inbreeding depression. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 6, p. 529-540, 2016.

XU. Y.; CROUCH, J. H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Science**, v. 48, p. 391-407, 2008.

APÊNDICE

Tabela 1. Heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (*f*) obtido nos indivíduos S₁ da progênie F0222, estimados por marcadores moleculares.

ID	He	Ho	<i>f</i>	ID	He	Ho	<i>f</i>	ID	He	Ho	<i>f</i>
P	0,97	1,00	0,00	33	0,96	0,56	0,44	60	0,95	0,50	0,50
1	0,96	0,50	0,50	34	0,94	0,33	0,66	61	0,96	0,72	0,27
2	0,95	0,50	0,50	35	0,96	0,61	0,39	62	0,96	0,56	0,44
8	0,95	0,44	0,55	36	0,95	0,22	0,78	63	0,96	0,61	0,38
10	0,94	0,22	0,78	37	0,95	0,50	0,49	64	0,95	0,39	0,61
11	0,96	0,56	0,44	38	0,95	0,17	0,83	65	0,95	0,39	0,61
12	0,96	0,56	0,44	39	0,95	0,44	0,55	66	0,94	0,28	0,72
13	0,95	0,61	0,38	40	0,95	0,61	0,38	67	0,95	0,33	0,67
14	0,95	0,50	0,50	41	0,95	0,44	0,55	69	0,95	0,39	0,61
15	0,96	0,67	0,33	42	0,96	0,56	0,44	70	0,95	0,39	0,61
16	0,95	0,39	0,61	43	0,95	0,50	0,50	71	0,95	0,33	0,66
17	0,95	0,56	0,44	44	0,96	0,50	0,50	72	0,96	0,72	0,27
18	0,96	0,56	0,44	45	0,95	0,39	0,61	73	0,96	0,67	0,33
19	0,96	0,61	0,39	46	0,95	0,50	0,50	74	0,96	0,56	0,44
20	0,96	0,72	0,27	47	0,95	0,56	0,44	75	0,96	0,61	0,39
21	0,95	0,67	0,33	48	0,95	0,61	0,38	76	0,95	0,56	0,44
22	0,94	0,28	0,72	49	0,96	0,67	0,33	77	0,95	0,39	0,61
23	0,96	0,61	0,39	50	0,95	0,50	0,50	78	0,95	0,50	0,50
24	0,95	0,56	0,44	51	0,95	0,39	0,61	79	0,95	0,44	0,55
25	0,95	0,50	0,50	52	0,95	0,39	0,61	81	0,95	0,56	0,44
26	0,96	0,67	0,33	53	0,95	0,56	0,44	82	0,96	0,78	0,22
27	0,95	0,50	0,50	54	0,96	0,44	0,56	83	0,95	0,44	0,55
28	0,94	0,39	0,61	55	0,96	0,56	0,44	89	0,95	0,56	0,44
29	0,96	0,56	0,44	56	0,95	0,50	0,49	90	0,95	0,50	0,49
30	0,94	0,33	0,66	57	0,95	0,56	0,44	91	0,96	0,67	0,33
31	0,96	0,56	0,44	58	0,95	0,50	0,50	Média	0,95	0,51	0,49
32	0,95	0,44	0,55	59	0,95	0,33	0,67				

ID: Indivíduo, P: referente ao parental da progênie autofecundada.

Tabela 2. Heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (*f*) obtido nos indivíduos S₁ da progênie F1378, estimados por marcadores moleculares.

ID	He	Ho	<i>f</i>	ID	He	Ho	<i>f</i>	ID	He	Ho	<i>f</i>
P	0,94	1,00	0,00	38	0,92	0,44	0,54	70	0,93	0,50	0,49
1	0,92	0,61	0,36	39	0,95	0,61	0,38	71	0,94	0,67	0,32
2	0,92	0,44	0,54	41	0,92	0,50	0,48	72	0,95	0,61	0,38
3	0,92	0,50	0,48	43	0,92	0,72	0,25	73	0,94	0,50	0,49
4	0,93	0,44	0,54	44	0,93	0,56	0,42	75	0,92	0,39	0,60
5	0,93	0,56	0,43	45	0,94	0,67	0,31	77	0,94	0,56	0,43
6	0,93	0,50	0,48	46	0,92	0,56	0,42	78	0,93	0,50	0,49
7	0,94	0,56	0,44	47	0,94	0,56	0,43	80	0,94	0,67	0,31
8	0,90	0,44	0,53	48	0,93	0,61	0,37	81	0,93	0,67	0,31
9	0,92	0,50	0,48	49	0,94	0,67	0,31	82	0,94	0,28	0,72
10	0,94	0,67	0,32	50	0,92	0,61	0,36	84	0,93	0,50	0,49
12	0,94	0,61	0,37	51	0,93	0,61	0,37	85	0,92	0,61	0,36
14	0,94	0,56	0,43	52	0,94	0,50	0,49	86	0,93	0,56	0,43
18	0,94	0,72	0,26	53	0,94	0,39	0,61	89	0,93	0,44	0,54
19	0,92	0,39	0,60	54	0,92	0,39	0,60	90	0,93	0,11	0,89
21	0,93	0,67	0,31	55	0,95	0,56	0,44	91	0,92	0,61	0,36
22	0,92	0,39	0,60	57	0,92	0,44	0,54	92	0,90	0,28	0,71
25	0,91	0,50	0,47	58	0,93	0,50	0,48	93	0,93	0,56	0,43
27	0,93	0,61	0,37	59	0,91	0,39	0,59	94	0,93	0,44	0,54
28	0,93	0,67	0,31	60	0,91	0,44	0,53	95	0,93	0,33	0,66
30	0,95	0,50	0,49	62	0,93	0,72	0,25	96	0,94	0,39	0,60
32	0,93	0,44	0,54	64	0,93	0,61	0,37	97	0,94	0,67	0,32
33	0,93	0,50	0,48	65	0,93	0,28	0,72	98	0,95	0,72	0,27
34	0,90	0,33	0,65	66	0,92	0,39	0,60	99	0,93	0,44	0,54
35	0,93	0,39	0,60	67	0,93	0,22	0,77	100	0,92	0,39	0,60
36	0,92	0,61	0,36	68	0,92	0,56	0,42	101	0,89	0,44	0,52
37	0,94	0,28	0,72	69	0,94	0,44	0,55	Média	0,92	0,51	0,49

ID: Indivíduo, P: referente ao parental da progênie autofecundada.

Tabela 3: Heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (*f*) obtido nos indivíduos S₁ da progênie F1662, estimados por marcadores moleculares.

ID	He	Ho	<i>f</i>	ID	He	Ho	<i>f</i>	ID	He	Ho	<i>f</i>
P	0,93	1,00	0,00	28	0,92	0,56	0,42	56	0,92	0,75	0,22
1	0,91	0,25	0,74	29	0,91	0,31	0,67	57	0,91	0,31	0,68
2	0,92	0,50	0,48	30	0,92	0,63	0,35	58	0,92	0,56	0,42
3	0,92	0,63	0,35	31	0,91	0,38	0,61	59	0,91	0,31	0,68
4	0,91	0,31	0,67	32	0,92	0,63	0,35	60	0,92	0,44	0,55
5	0,91	0,50	0,47	33	0,93	0,69	0,29	61	0,90	0,38	0,61
6	0,92	0,56	0,42	34	0,92	0,75	0,22	62	0,90	0,38	0,61
7	0,92	0,56	0,42	35	0,92	0,69	0,28	63	0,91	0,50	0,48
8	0,92	0,75	0,25	36	0,92	0,44	0,55	65	0,93	0,69	0,29
9	0,92	0,63	0,35	37	0,91	0,38	0,61	66	0,93	0,81	0,15
10	0,92	0,44	0,55	38	0,90	0,38	0,60	67	0,91	0,38	0,61
11	0,92	0,56	0,41	40	0,90	0,56	0,40	68	0,92	0,56	0,42
12	0,92	0,69	0,28	41	0,91	0,25	0,74	69	0,91	0,56	0,41
13	0,92	0,63	0,35	42	0,91	0,50	0,48	70	0,90	0,38	0,61
14	0,91	0,31	0,68	43	0,91	0,38	0,61	71	0,93	0,81	0,15
15	0,91	0,50	0,48	44	0,92	0,56	0,42	72	0,92	0,50	0,48
16	0,93	0,56	0,42	45	0,91	0,50	0,48	73	0,91	0,50	0,48
17	0,91	0,50	0,48	47	0,92	0,69	0,28	74	0,91	0,25	0,74
18	0,92	0,44	0,55	48	0,92	0,69	0,28	75	0,93	0,75	0,22
19	0,91	0,31	0,68	49	0,91	0,50	0,48	76	0,91	0,38	0,61
21	0,90	0,44	0,54	50	0,91	0,31	0,67	77	0,92	0,63	0,35
22	0,92	0,38	0,61	51	0,91	0,50	0,47	78	0,91	0,63	0,34
24	0,92	0,50	0,48	52	0,93	0,75	0,22	79	0,93	0,56	0,42
25	0,92	0,44	0,55	53	0,90	0,31	0,67	80	0,93	0,63	0,35
26	0,93	0,50	0,48	54	0,91	0,63	0,34	81	0,91	0,50	0,48
27	0,92	0,63	0,35	55	0,92	0,56	0,41	Média	0,91	0,52	0,49

ID: Indivíduo, P: referente ao parental da progênie autofecundada.

CAPÍTULO 2

VARIAÇÃO MORFOLÓGICA DE GRÂNULOS DE AMIDO EM PROGÊNIES S₁ DE MANDIOCA

VARIAÇÃO MORFOLÓGICA DE GRÂNULOS DE AMIDO EM PROGÊNIES S₁ DE MANDIOCA

RESUMO: A necessidade de geração de novas variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com características diferenciais de amido tem motivado o desenvolvimento de novas pesquisas. O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações morfológicas nos grânulos de amido e o ganho genético em populações segregantes S₁ de mandioca. Os amidos dos acessos (S₀): BGM0222, BGM1378 e BGM1662 e de suas progênies autofecundas (S₁): F0222, F1378 e F1662, contendo 78, 80 e 76 indivíduos, respectivamente, foram avaliados para as características: área (AG, μm^2), perímetro (PG, μm), comprimento (CG, μm) e número de grânulos de amidos (NG). As avaliações foram realizadas por meio de análise de imagens obtidas via microscopia óptica. Com a seleção dos indivíduos transgressivos para os caracteres morfológicos do grânulo de amido em populações S₁, é possível se obter ganho de seleção para valores acima e abaixo da média dos parentais S₀, onde os ganhos de seleção podem chegar até 31%, 11%, 10% e 52% para os caracteres área, comprimento, perímetro do grânulo e número de grânulos, respectivamente. O tamanho médio do grânulo de amido variou de 9 a 13 μm entre indivíduos em uma progênie S₁. Correlações positivas de elevada magnitude foram observadas entre PG x CG (1), AG x PG (0,99), AG x CG (0,99), PTR x PAM (0,99) e de moderada entre PPA x PTR (0,49), AP x PPA (0,46), PPA x PAM (0,46), AP x PAM (0,42) e AP x PTR (0,41). Correlações negativas de elevada magnitude foram observadas entre NG com AG, CG e PG ($\cong - 0,7$). Populações segregantes de mandioca permitem obter indivíduos com diferentes características morfológicas em grânulo de amido, sendo possível se obter ganhos genéticos com a seleção.

Palavras chaves: *Manihot esculenta* Crantz; autofecundação; endogamia; tamanho de grânulo.

MORPHOLOGICAL VARIATION OF STARCH GRANULES IN CASSAVA S₁ PROGENIES

ABSTRACT: The need for developing new cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties with different starch characteristics has greatly motivated the development of new research. The objective of the present study was to evaluate morphological alterations in starch granules as well as genetic gains in segregating S₁ cassava populations. Starch from accessions (S₀): BGM0222, BGM1378 and BGM1662 and of their self-fertilized progênies (S₁): F0222, F1378 and F1662, with 78, 80 and 76 individuals, respectively, were evaluated as to the following characteristics: granule area (GA, μm^2), granule perimeter (GP, μm), granule length (GL, μm) and number of starch granules (NG). Evaluations were carried out via image analysis obtained by optical microscopy. With the selection of transgressive individuals for the morphological characteristics of starch granules in the S₁ progenies, it is possible to obtain selection gains for values higher and lower than the average of the S₀ genitors, whereas selection gains can reach up to 31%, 11%, 10% and 52% for the characteristics of area, length perimeter and number of starch granules, respectively. Average size of the starch granule varied from 9 to 13 μm among individuals in an S₁ progeny. Positive and high correlations between the individuals were found for GP x CG (1), GA x GP (0.99), GA x CG (0.99), PR x SP (0.46), AP x SP (0.42) and AP x PR (0.41). Negative and high correlations were found between NG with GA, CG and GP (\cong - 0,7). Cassava segregating populations allows the obtainment of individuals with different morphological characteristics as for starch granules, enabling obtainment of genetic gains with the selection.

Key words: inbreeding; *Manihot esculenta* Crantz; self-fertilization; size of starch granules.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das culturas mais importantes do mundo, pois é um dos quatro principais alimentos básicos que compõem a dieta de milhões de pessoas (NASSAR; ORTIZ, 2007) e também por apresentar boa produção em condições adversas de cultivo, como seca e solos marginais de baixa fertilidade (CEBALLOS et al., 2006). Além disso, é uma das poucas culturas na qual todas as partes da planta são utilizadas, desde as folhas para alimentação humana e animal, às hastes para propagação vegetativa da planta e as raízes; principal produto da mandioca devido ao acúmulo de amido, que são empregadas tanto para alimentação humana quanto para fins industriais (BREUNINGER et al., 2009).

No cenário global, o cultivo de mandioca é majoritariamente realizado por pequenos agricultores (HALSEY et al., 2008). No Brasil, o cultivo da mandioca possui grande relevância no contexto da agricultura familiar, todavia, grandes plantios também têm sido realizados para atender a demanda agroindustrial (OLIVEIRA et al., 2012). A cultura da mandioca apresenta um grande potencial para a agroindústria, porém ainda há necessidade de se desenvolver genótipos com perfil mais adequado a este tipo de mercado (OLIVEIRA et al., 2014), considerando fatores como alta produtividade de raízes e elevado teor de matéria seca (CEBALLOS et al., 2004). Por outro lado, é fundamental considerar a tendência atual das indústrias de alimentos e agricultores que buscam amidos nativos com características especiais que poderiam substituir os amidos química ou fisicamente modificados em algumas situações, ou mesmo contribuir para abertura de novos mercados (LEONEL, 2007; VASCONCELOS et al., 2017).

Para as aplicações industriais, o amido de mandioca geralmente passa por processos físico-químicos, como tratamentos térmicos ou enzimáticos, que alteram as propriedades físico-químicas da pasta de amido (BREUNINGER et al., 2009). O tamanho dos grânulos é considerado também um fator que contribui para as mudanças nas características do amido, como poder de inchaço do grânulo e gelatinização (NUWAMANYA et al., 2010). Destaca-se que amido com grânulos pequenos (< 10 µm) pode ser utilizado para desenvolver filmes plásticos biodegradáveis ou ser empregado como substituto de gorduras na indústria de alimentos (LEONEL, 2007). Por outro lado, grânulos maiores (>20 µm) são

desejados por apresentarem menor teor amilose e menor pico de temperatura de gelatinização (NUWAMANYA et al., 2010).

Os grânulos de amido são partículas semicristalinas que variam de 0,1 a 200 µm, dependendo da sua origem botânica e são compostos principalmente por dois polímeros de glicose chamados de amilose e amilopectina (LINDEBOOM et al., 2004). O tamanho e forma do grânulo de amido são características importantes, pois estão relacionados com diversos atributos como: propriedades de pasta, gelatinização, susceptibilidade enzimática, solubilidade e relação amilose/amilopectina (LINDEBOOM et al., 2004). Na mandioca, o grânulo de amido possui forma circular, oval e truncada (circular com uma superfície plana em um dos lados), com tamanho variando de 4 a 40 µm e teor de amilose entre 16% e 28% (CEBALLOS et al., 2007; BREUNINGER et al., 2009; MWETA et al., 2008).

Para culturas como milho, trigo e cevada, foi observado que a seleção em populações segregantes permitiu a obtenção de indivíduos com variação significativa para características relacionadas à morfologia do grânulo de amido e também para alterações em propriedade de amido como a relação amilose/amilopectina. Dessa forma, populações segregantes podem ser utilizadas para se obter indivíduos com propriedades específicas com distintas finalidades (CAMPBELL et al., 1996; IGREJAS et al., 2002; JAISWAL et al., 2014). No caso da cultura da mandioca, a variabilidade genética para características relacionadas aos grânulos de amido, já foram relatadas na literatura (CEBALLOS et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2017), nos permitindo inferir que ganhos genéticos são passíveis de serem obtidos.

Recentemente, populações segregantes de mandioca têm sido obtidas via autofecundação para entendimento e exploração dos efeitos da endogamia. Os resultados desses estudos são animadores, visto que já foram observados indivíduos com desempenho agrônomico e nível de resistência a doenças superior aos parentais não endogâmicos (FREITAS et al., 2016; KAWEESI et al., 2016). Atributos relacionados ao amido também foram estudados, sendo reportado que em populações S_1 é possível se obter indivíduos com grande variação no teor de amilose, de 17% até 34% (KAWUKI et al., 2011). Destaca-se também a obtenção de genótipos que expressaram o gene recessivo *waxy*, o qual produz amido com teor de amilose próximo a zero (CEBALLOS et al., 2007) e

ainda indivíduos mutantes, que apresentam tamanho médio dos grânulos de amido de 5 μ m, com elevado teor de amilose (CEBALLOS et al., 2008). Desse modo, estudos adicionais, sobretudo no germoplasma brasileiro, são necessários para quantificar a variabilidade nos tamanhos dos grânulos em populações S_1 , avaliar os ganhos genéticos potenciais com a seleção de indivíduos com maior e menor tamanho de grânulos de amido, e averiguar a relação dessas características com outras de interesse. Assim sendo, o objetivo desse estudo foi avaliar as alterações morfológicas nos grânulos de amido e os ganhos genéticos previstos para estas características em populações segregantes S_1 de mandioca. Nossos dados demonstraram que a autofecundação de acessos de mandioca gerou indivíduos S_1 portadores de características dos grânulos de amido bastante diferenciadas em relação aos genitores e com elevada amplitude, o que possibilitou a obtenção de ganhos com a seleção dos indivíduos transgressivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de progênies autofecundadas

Para a obtenção das progênies autofecundadas (S_1) foram selecionados como genitores (S_0) três acessos de mandioca, o BGM-0222, o BGM-1378 e o BGM-1662 pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de mandioca (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas-BA, Brasil. Para os três acessos de mandioca, as autofecundações foram realizadas artificialmente e controladas no campo experimental da Embrapa, no ano de 2014. Após a maturação dos frutos, estes foram coletados e armazenados em sacos de papel para conservar as sementes. As sementes obtidas da autofecundação foram armazenadas por um período de dois meses para superar a dormência. Posteriormente, as sementes de cada acesso foram colocadas para germinar em tubetes contendo substrato comercial, fibra de coco e vermiculita, na proporção de 2:1:1, sendo mantidos em casa de vegetação com condições controladas (temperatura de 29 ± 2 °C e umidade de $65 \pm 5\%$). Aos 50 dias após a germinação, as plantas com cerca de 30 cm de tamanho, foram transplantadas para o campo de *seedlings*.

Na fase de *seedlings* as plantas de cada progênie S_1 de mandioca, foram plantadas na área experimental do campo de autofecundação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em Cruz das Almas-BA, no ano de

2014. Essa fase foi composta por 91, 101 e 82 indivíduos para as progênies F0222, F1378 e F1662 respectivamente, sendo que apenas um total de 78, 80 e 76 indivíduos nas progênies F0222, F1378 e F1662 respectivamente, apresentaram raízes suficiente pra extração de amido. Doze meses após o plantio, as plantas foram colhidas, sendo as raízes utilizadas para a análise das características morfológicas dos grânulos de amido.

Extração de amido

As plantas coletadas foram levadas para o Laboratório de Práticas Culturais de Mandioca (LCTM) da Embrapa Mandioca e Fruticultura para o processamento do amido. As raízes selecionadas foram lavadas em água corrente, e em seguida seccionadas até completar 500 g para o processo de extração. As partes selecionadas foram trituradas em liquidificador com 500 mL de água com hélice não cortante (para diminuir o cisalhamento dos grãos de amido e, conseqüente modificação física) durante 90 segundos.

Ao material triturado foi posteriormente adicionado 3,5 litros de água fria para filtrar a massa com auxílio de um tecido tipo “voal” e peneirado com peneira granulométrica (220 Mesh) colocada sobre um balde de 5 litros de volume. Em seguida, o material filtrado foi acondicionado em câmara fria por 12 horas para decantação do amido. Em seguida, foi retirado o sobrenadante, sendo adicionados 20 mL de álcool 95% ao amido para acelerar a secagem com posterior descarte do álcool. Posteriormente o amido foi retirado dos baldes e colocado em recipientes e acondicionado em estufa com circulação de ar forçada a 45° C por quatro dias. O amido seco foi macerado com auxílio de pistilo e grau para obtenção de um pó de textura fina e homogênea. Em seguida, o pó foi acondicionado em sacos plásticos, selado a vácuo e armazenados em geladeira a 8 °C para melhor conservação do amido.

Avaliação da morfologia de grânulos de amido

A confecção das lâminas de amido foi realizada a partir da diluição de 1 g do amido macerado em 4 g de água, simulando a concentração de amido em raízes de mandioca. Em seguida, realizou-se uma diluição contendo 0,8 mL da solução de amido com 1,8 mL de iodo 2%. Dessa solução foram retirados 0,2 mL para a confecção da lâmina e transferido para câmara de Neubauer para

observação de microscopia óptica em aumento de 400 vezes. Para cada genótipo foram confeccionadas três laminas, e para cada lâmina, foram feitas cinco fotos, totalizando 15 fotos por genótipo.

As análises das imagens foram realizadas com o auxílio do software ImageJ (SCHNEIDER., 2012) para a determinação das características: número dos grânulos em um grama de amido; área dos grânulos (μm^2); comprimento dos grânulos (μm); perímetro do grânulo (μm).

Estabelecimento do ensaio de avaliação clonal (CET)

Aos 12 meses após o plantio dos *seedlings*, as plantas foram selecionadas e colhidas individualmente para o estabelecimento do ensaio de avaliação clonal (CET). O critério adotado para selecionar os indivíduos para compor o CET foi a capacidade das plantas de produzirem, no mínimo, cinco manivas com 20 cm de comprimento cada.

O CET foi instalado na área experimental da Cooperativa Aliança do Amido (COOPAMIDO), em Santo Antônio de Jesus-BA situada a 13°10'56" de Latitude Sul e 39°25'30" de Longitude Oeste. Um total de 233 indivíduos foram selecionados da fase de *seedlings*, sendo 76, 78 e 79 das progênies F1662, F0222 e F1378, respectivamente. Os 233 indivíduos S_1 juntamente com os progenitores S_0 foram avaliados em um experimento instalado sob o delineamento de blocos aumentados, com os indivíduos distribuídos em quatro blocos, e com parcelas constituídas por 5 plantas. Um total de 14 variedades locais e melhoradas (BRS Caipira, Cigana Preta, BRS Verdinha, Correntão, Corrente, BRS Dourada, Eucalipto, BRS Formosa, BRS Gema de ovo, IAC 90, BRS Kiriris, BRS Poti branca, Salangor e Vassoura preta) foram utilizadas como testemunhas. O espaçamento utilizado foi de 0,8 m entre plantas e 0,9 m entre linhas. Os tratos culturais seguiram as recomendações básicas de Souza et al. (2006).

Para o ensaio clonal, aos 12 meses após o plantio, foi realizada a colheita e a avaliação das seguintes características agronômicas: altura de planta (AP - mensurada em metros); produtividade de parte aérea (PPA - mensurado em t ha^{-1}); produtividade total de raízes (PTR - mensurado em t ha^{-1}); produtividade de amido (PAM - mensurado em t ha^{-1}); teor de matéria seca (MS - mensurado em % pelo método da balança hidrostática, de acordo com KAWANO et al. 1987).

Análises dos dados

As análises de variância para os caracteres morfológicos foram realizadas com o auxílio do pacote “easynova” implementado no software R (R Development Core Team, 2017). O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso com três repetições (lâminas). Para cada lâmina foram feitas cinco fotos totalizando quinze fotos por genótipos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Para os dados fenotípicos dos caracteres agronômicos foi realizada a análise de acordo com o modelo linear misto, referente à avaliação sob o delineamento de blocos aumentados (RESENDE, 2007). A análise foi realizada considerando o seguinte modelo linear: $y = Xf + Zg + Wb + e$, sendo: y - vetor dos dados; f - vetor dos efeitos assumidos como fixo (médias das testemunhas e média dos indivíduos); g - vetor dos efeitos genotípicos dos indivíduos (aleatórios); b - vetor dos efeitos ambientais de blocos (aleatórios); e - vetor dos resíduos (aleatórios). As matrizes de incidência dos efeitos aleatórios estão representadas pelas letras maiúsculas.

Para o estudo da relação entre o número e o comprimento dos grânulos de amido, foram confeccionados histogramas. Para isso, foram selecionados os dois indivíduos dentro de cada progênie S_1 mais contrastantes para as duas características. Os ganhos esperados com a seleção (GS) foram obtidos para cada característica considerando a média dos 10 indivíduos (S_1) com as maiores e menores médias em relação ao parental não endogâmico (S_0) em cada uma das progênies avaliadas. A partir dos valores de caracteres agronômicos e morfológicos dos grânulos de amido foi estimada a correlação de Pearson, com uso do pacote “PerformanceAnalytics” no software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017).

RESULTADOS

Análise de Variância

Foram observados efeitos significativos apenas para a fonte de variação “genitor” para a característica número de grânulos (Tabela 1), demonstrando que o uso da autofecundação pouco afetou as médias das características relacionadas ao tamanho e número dos grânulos de amido de mandioca. Porém, foi demonstrada a variabilidade genética existente entre os diferentes genitores

utilizados nas autofecundações para estas características, sobretudo para número de grânulos de amido. Também não foram observados efeitos significativos da interação entre genitor x geração (S_0 e S_1). As estimativas do coeficiente de variação (CV) foram de baixa magnitude para as características de área, perímetro e comprimento dos grânulos (12,02%, 6,09% e 6,05%, respectivamente), demonstrando a boa precisão experimental nestas análises. Por outro lado, o CV para número de grânulos foi mais elevado (25,18%), embora considerado mediano para uma característica tipicamente quantitativa.

Tabela 1. Resumo da análise de variância das características morfológicas dos grânulos de amido em diferentes genitores e progênies S_1 de mandioca.

Fonte de variação	GL ¹	Quadrado Médio			
		Área do Grânulo	Perímetro do Grânulo	Comprimento do grânulo	Número de Grânulos
Genitor (Gen)	2	248,07	7,10	0,70	8279,68*
Geração (Ger)	1	93,51	1,58	0,13	129,44
Bloco	2	5,63	0,05	0,01	200,88
Gen*Ger	2	66,47	1,29	0,13	197,03
Resíduo	703	174,57	5,12	0,46	1848,42
CV (%)		12,02	6,09	6,05	25,18
Média		109,48	37,11	11,21	166,40

¹GL: grau de liberdade; *significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Em relação ao número de grânulos de amido houve diferença significativa entre os genitores (S_0) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), tendo um amplo contraste entre os genitores BGM0222 (141,28) e BGM1662 (193,95), enquanto que o genitor BGM1378 apresentou número intermediário de grânulos de amido (171,67) (Tabela 2). Por outro lado, mesmo havendo um contraste entre as médias das progênies S_1 semelhante à S_0 , não houve diferença significativa entre os valores médios do número de grânulos de amido entre as progênies S_1 derivadas dos genitores F0222 (144,00), F1378 (178,00) e F1662 (191,00). Possivelmente isso ocorreu em função da grande variabilidade genética liberada dentro das progênies S_1 , como resultado da autofecundação. Neste caso, houve

grande amplitude, mas a média do número de grânulos de amido foi muito semelhante aos genitores (Figura 1).

Tabela 2. Média das características morfológicas de grânulos de amido avaliados em diferentes progêneses S_0 e S_1 de mandioca.

Progênie	Área do Grânulo (μm^2)		Perímetro do Grânulo (μm)		Comprimento do Grânulo (μm)		Número de grânulos de amido	
	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1	S_0	S_1
	F0222	110,08a*	114,40a	37,13a	37,70a	11,21a	11,39a	141,28c
F1378	111,64 ^a	112,00a	37,51a	37,50a	11,35a	11,35a	171,67b	178,00a
F1662	103,05 ^a	103,00a	36,05a	36,13a	10,88a	10,95a	193,95a	191,00a

*:Médias seguidas pelas mesma letra na coluna não diferenciam entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade; S_0 : Parental; S_1 : Progênie autofecundada.

Análise da morfologia dos grânulos de amido em indivíduos S_1 de mandioca

De modo geral, houve uma grande amplitude nos valores de todas as características morfológicas dos grânulos de amido entre os indivíduos S_1 avaliados nas três progêneses de mandioca (Figura 1). Entre os genitores S_0 BGM0222, BGM1378 e BGM1662, as médias foram semelhantes para a maioria das características morfológicas avaliadas, exceto número de grânulos, conforme apresentado na Tabela 1 e Figura 1. Por outro lado, não houve diferença nas médias das progêneses S_1 em comparação com a S_0 . Entretanto, a elevada variabilidade genética liberada com o uso da autofecundação, permitiu a geração de indivíduos com fenótipos bastante divergentes em comparação com os dos parentais.

As variações das médias dos indivíduos dentro de cada progênie S_1 foram semelhantes para a maioria dos caracteres morfológicos, exceto para número de grânulos de amido, cuja variação na progênie F0222 foi menor (90 a 290) em comparação com as progêneses F1378 e F1662 (95 a 360). Para as demais características a variação foi de aproximadamente 75 a 152 μm^2 (área do grânulo), 31 a 43 μm (perímetro do grânulo), 8,5 a 13,2 μm (comprimento do grânulo) em todas as progêneses S_1 (Figura 1).

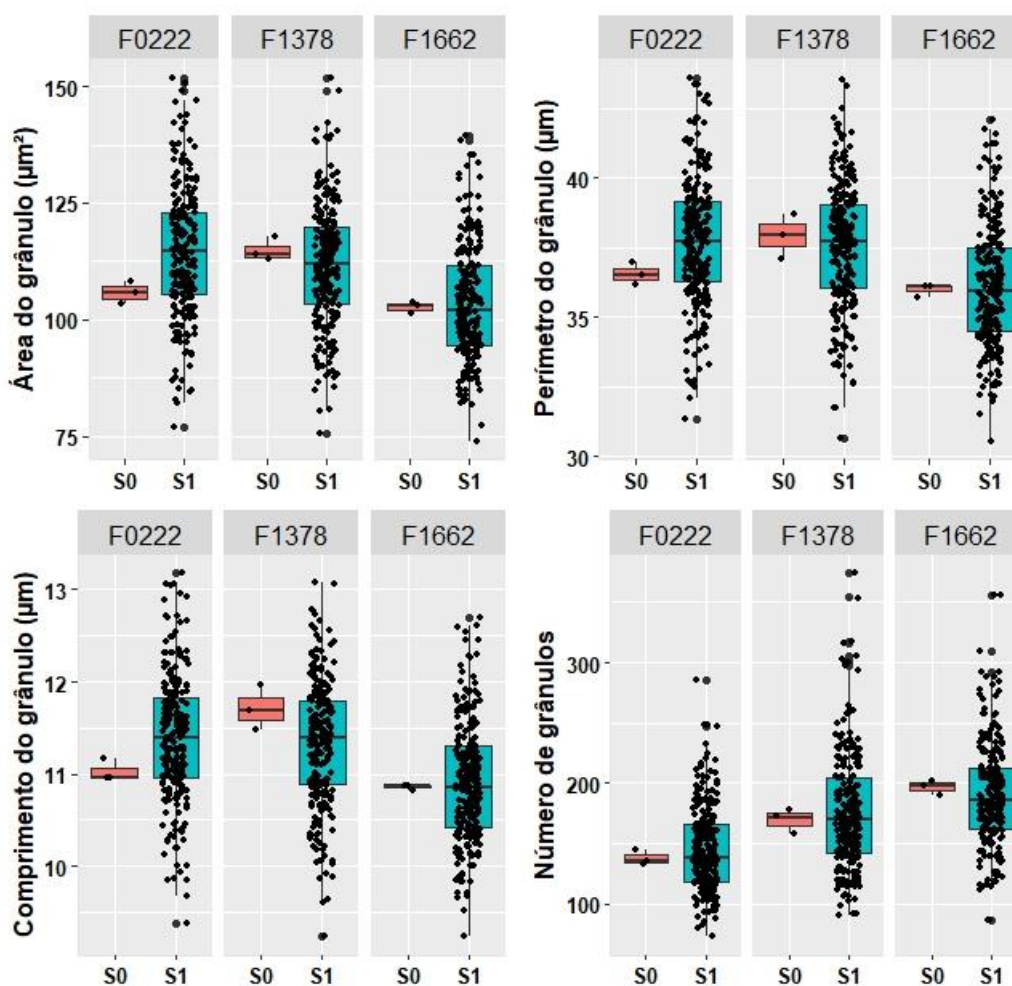


Figura 1: Boxplot das características morfológicas de grânulos de amido avaliados em genitores de mandioca (S_0) e suas progênes autofecundadas (S_1).

De modo geral, os tamanhos dos grânulos de amido variaram bastante dentro das progênes, sendo possível observar dentro de um mesmo clone S_1 , variação no comprimento dos grânulos de 4 a 30 μm (Figura 2). Portanto, além da grande variabilidade na média dos indivíduos S_1 , a autofecundação também gerou indivíduos portadores de diferentes distribuições no comprimento dos grânulos de amido. Por exemplo, os indivíduos F0222-43, F1378-34 e F1662-62, apresentaram uma variação no comprimento dos grânulos de 4 a 20 μm , sendo que mais de 70% dos grânulos foram menores que 15 μm . Já os indivíduos F0222-56, F1378-98 e F1662-75, apresentaram grânulos variando de 4 até 30 μm , porém com uma distribuição mais uniforme dos grânulos entre as classes, com aproximadamente 30% dos grânulos menores que 10 μm , 30% entre 10 e 15 μm , e 40% acima de 15 μm (Figura 2).

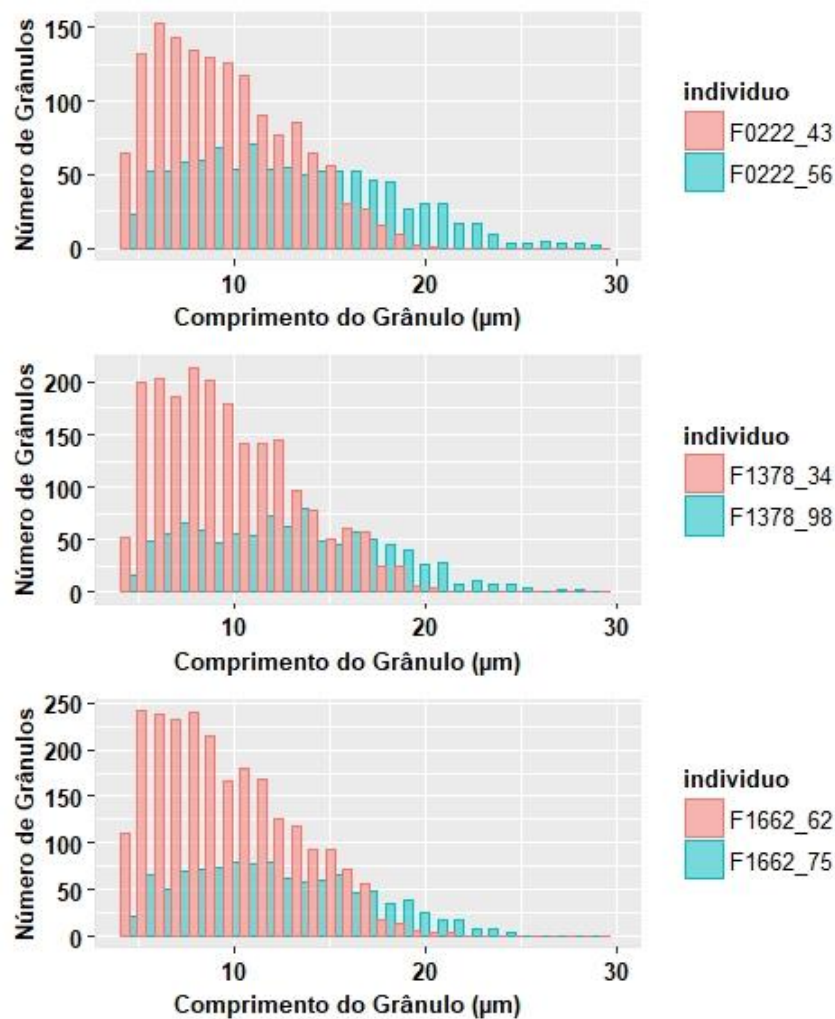


Figura 2. Histogramas da variação no comprimento do grânulo de amido entre indivíduos contrastantes dentro de progênes S₁ de mandioca.

Ganho genético com seleção

O número de indivíduos S₁ com médias acima ou abaixo da média dos respectivos parentais, encontra-se na Tabela 4. Para todas as progênes e características avaliadas, foram identificados indivíduos com médias estatisticamente diferentes (acima ou abaixo) dos valores médios encontrados para os parentais (S₀). Entre as progênes, a F1378 apresentou menor porcentagem (18%) de indivíduos que diferiram estatisticamente do parental S₀, seguida pela F1662 (32%) e F0222 (37%) (Tabela 4). Dentre os indivíduos que diferiram do parental pelo teste *t*, a maioria apresentou valores acima das médias do parental S₀ na progênie F0222, enquanto que para as progênes F1378 e F1662, a média entre os indivíduos S₁ para valores maiores ou menores que a média dos parentais, foi similar.

Tabela 4. Número de indivíduos das progêneses S_1 de mandioca com média superior (\uparrow) e inferior (\downarrow) aos parentais (S_0) para características morfológicas dos grânulos de amido em mandioca.

Progênie	Área do Grânulo		Perímetro do Grânulo		Comprimento do Grânulo		Número de Grânulos	
	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow
F0222	50	28	49	29	48	30	38	40
	24 *	6	20	8	21	7	18	11
F1378	41	39	44	36	44	36	41	39
	7	6	5	8	7	10	9	8
F1662	35	41	35	41	35	41	37	39
	14	17	14	14	15	14	5	13

*Número de indivíduos S_1 entre módulos diferem significativamente da geração S_0 pelo teste t .

A autofecundação contribuiu para obtenção de diferenças significativas para as características relacionadas à morfologia dos grânulos de amido entre indivíduos dentro das progêneses S_1 e também em relação aos parentais (S_0). Isso possibilita a obtenção de ganhos genéticos com a seleção dos indivíduos transgressivos, os quais podem ser explorados de acordo com suas potencialidades de uso para cada tipo de amido.

A seleção de indivíduos S_1 para qualquer uma das quatro características relacionadas ao grânulo de amido pode resultar em ganhos genéticos (Tabela 5). Para a característica área do grânulo, a seleção dos 10 indivíduos S_1 transgressivos, proporcionou um aumento predito de 22,80 a 31,18% em comparação com o genitor S_0 e de 18,16 a 21,16% em comparação com a média dos indivíduos S_1 . Para redução da área dos grânulos de amido, os ganhos variaram de -15,73 a -19,00% em comparação com o genitor S_0 e de -16,33 a -19,26% em comparação com a média dos indivíduos S_1 . Os ganhos preditos, portanto, também foram dependentes da progênie S_1 , na qual a F0222 e a F1662, foram as mais contrastantes.

Para as características comprimento e perímetro do grânulo de amido, os ganhos preditos foram muito semelhantes entre as progêneses de mandioca, tanto para aumento quanto para redução do caráter, cuja variação ficou entre 8,99 e

10,65% para aumento da característica e entre 8,11 a 10,31% para redução, em comparação com a S_0 . Em comparação com a média da S_1 , o aumento predito variou de 8,69 a 10,41% e a redução predita variou de 8,39 a 11,06% para ambas as características. O menor ganho no aumento, ou na redução do comprimento e perímetro do grânulo de amido, deve-se à sua menor amplitude em comparação com às demais características.

Tabela 5. Ganho genético com a seleção (GS) dos dez indivíduos com maior média superior e inferior dentro de cada progênie em comparação com os parentais (S_0) e populações autofecundadas (S_1).

Área do Grânulo						
Progênie	Aumento			Redução		
	\bar{x}_{10}	GS% (S_0)	GS% (S_1)	\bar{x}_{10}	GS% (S_0)	GS% (S_1)
F0222	135,18	22,80	18,16	92,76	15,73	18,92
F1378	132,36	21,09	18,18	90,43	19,00	19,26
F1662	124,79	31,18	21,16	86,18	16,37	16,33
Comprimento do Grânulo						
Progênie	Aumento			Redução		
	\bar{x}_{10}	GS% (S_0)	GS% (S_1)	\bar{x}_{10}	GS% (S_0)	GS% (S_1)
F0222	12,38	10,44	8,69	10,13	9,63	11,06
F1378	12,37	8,99	8,99	10,18	10,31	10,31
F1662	12,03	10,57	9,86	9,90	9,01	9,59
Perímetro do Grânulo						
Progênie	Aumento			Redução		
	\bar{x}_{10}	GS% (S_0)	GS% (S_1)	\bar{x}_{10}	GS% (S_0)	GS% (S_1)
F0222	41,06	10,58	8,91	34,12	8,11	9,50
F1378	40,96	9,20	9,23	33,68	10,21	10,19
F1662	39,89	10,65	10,41	33,10	8,18	8,39
Número de Grânulos						
Progênie	Aumento			Redução		
	\bar{x}_{10}	GS% (S_0)	GS% (S_1)	\bar{x}_{10}	GS% (S_0)	GS% (S_1)
F0222	208,00	47,23	44,44	101,00	28,51	29,86
F1378	261,13	52,11	46,70	117,20	31,73	34,16
F1662	258,90	33,49	35,55	134,76	30,52	29,45

S_0 : Parental; S_1 : Progênies autofecundadas.

O número de grânulos foi a característica que apresentou maior ganho com a seleção, uma vez que em comparação com a S_0 a variação no aumento predito foi de 33,49% (F1662) a 52,11% (F1378) e a redução no número de grânulos variou de 28,51% (F1662) a 31,73% (F1378) (Tabela 5). Em comparação com a média da S_1 , o aumento no número de grânulos de amido variou de 35,55% (F1662) a 46,70% (F1378) e a redução predita foi de 29,45% (F1662) a 34,16% (F1378).

Correlações entre dados agronômicos e de morfologia de grânulos de amido

Dentre as características morfológicas dos grânulos de amido, aquelas relacionadas às suas dimensões, foram altamente correlacionadas, a exemplo da elevada correlação positiva entre a área do grânulo com perímetro (0,99) e com o comprimento dos grânulos (0,99); e entre perímetro e comprimento do grânulo de amido (1,00) (Figura 3). Por outro lado, para número de grânulos de amido as correlações com as outras três características morfológicas dos grânulos de amido (área, perímetro e comprimento dos grânulos) foram negativas, diferentes de zero e com valores entre -0,67 e -0,71.

As correlações entre as características morfológicas do grânulo de amido e os cinco caracteres agronômicos, não diferiram de zero, indicando que não existe associação linear entre essas características (Figura 3). Assim, a seleção para aumento ou redução no número de grânulos de amido, parece não influenciar na produtividade ou no teor de matéria seca das raízes, de modo que a seleção dessas características morfológicas pode ser feita de forma independente da seleção praticada para as características agronômicas.

Para as características agronômicas avaliadas nas progênies S_1 , o teor de matéria seca nas raízes, apresentou correlações diferentes de zero, porém de baixa magnitude com produtividade de raízes (0,23) e amido (0,29). Por outro lado, a correlação entre o teor de matéria seca nas raízes x altura de planta e produtividade da parte aérea, não diferiram de zero, evidenciando que características da parte aérea também não influenciam diretamente no teor de matéria seca nas raízes de indivíduos S_1 de mandioca. Já as características da parte aérea apresentaram magnitudes medianas e diferentes de zero com a produtividade de raízes, cujas estimativas foram de 0,41 entre produtividade de

raízes x altura de planta e de 0,49 entre produtividade de raízes x produtividade da parte aérea. Quanto às correlações com a produtividade de amido, os valores foram diferentes de zero e de magnitudes medianas com altura de planta (0,42), produtividade da parte aérea (0,46) e produtividade de raízes (0,99) (Figura 3).

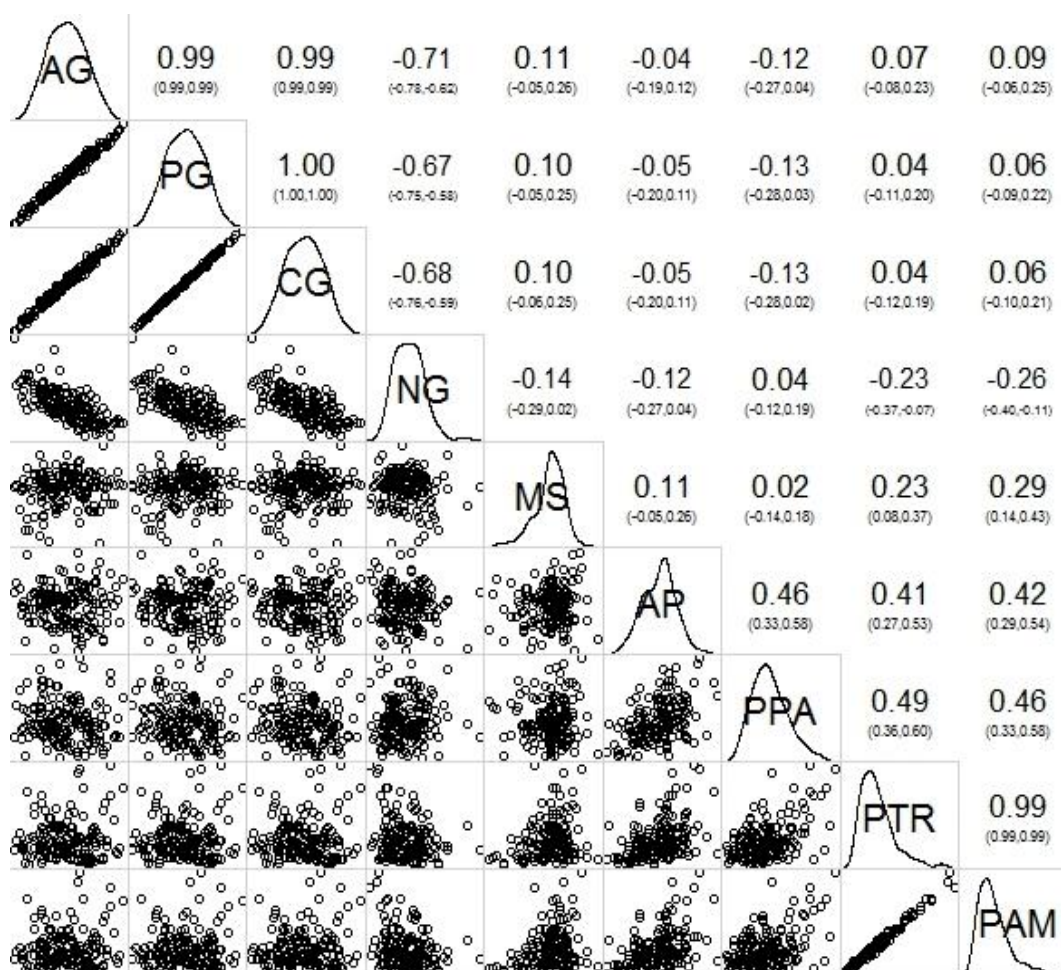


Figura 3: Correlação de Pearson entre os caracteres agronômicos e de morfologia do grânulo de amido em progênies S₁ mandioca. AG: área dos grânulos; PG: perímetro do grânulo; CG: comprimento dos grânulos; NG: número de grânulos; MS: teor de matéria seca nas raízes; AP: altura de planta; PPA: produtividade da parte aérea; PTR: produtividade de raízes; PAM: produtividade de amido.

DISCUSSÃO

A variabilidade para características relacionadas à morfologia do grânulo de amido tem sido demonstrada em outras culturas, a exemplo do milho, cevada e trigo (CAMPBELL et al., 1996; JAISWAL et al., 2014; WILSON et al., 2006).

Nesses estudos os autores relataram que a diversidade entre genótipos para o tamanho do grânulo de amido, exerce influência nas propriedades físico-químicas do mesmo, sendo possível identificar genótipos com potencial para explorar novos mercados da indústria de amido. Recentemente, esse tipo de caracterização também tem ganhado atenção dos programas de pesquisa em mandioca (CEBALLOS et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2017), com o intuito de se desenvolver novos genótipos que atendam as demandas do mercado por amido com propriedades específicas. No presente trabalho, mesmo com a análise de apenas três acessos de mandioca analisados, diferenças significativas entre genitores e progênes foram identificadas em diversas características de grânulos de amido. Portanto, considerando o grande número de acessos de mandioca armazenado nos bancos de germoplasma do país (cerca de 4.000), ainda é possível encontrar uma diversidade ainda não explorada nestes recursos genéticos.

A ausência de significância entre as médias das progênes S_0 e S_1 , demonstra que a autofecundação exerceu pouca influência na expressão das características relacionadas aos grânulos de amido nos acessos BGM0222, BGM1378 e BGM1662. Estudos posteriores, envolvendo a autofecundação de um maior número de genitores pode indicar com precisão, se os efeitos relacionados à autofecundação podem realmente causar algum tipo de depressão por endogamia, que pode ser observada nas características dos grânulos de amido. Outros estudos em mandioca têm demonstrado que a depressão por endogamia é bastante forte para atributos agrônômicos, variando de 55% a 89% para produtividade de raiz, 7% a 58% para produtividade de parte aérea, e 25% a 77% para índice de colheita (FREITAS et al., 2016; ROJAS et al., 2009). Entretanto, esses autores mencionam que a depressão por endogamia é altamente dependente dos genitores utilizados nas autofecundações. Por exemplo, a depressão por endogamia pode variar entre genitores de 1% a 55%, 0% a 7% e 6% a 25% para produtividade de raízes, produtividade de parte aérea e índice de colheita, respectivamente (FREITAS et al., 2016).

Sobretudo, para as características de área, perímetro e comprimento dos grânulos de amido, além da não significância das médias entre gerações ($S_0 \times S_0$; $S_1 \times S_1$), também não foi detectada nenhuma interação entre geração x genitor ($S_0 \times S_1$). Resultados concordantes na cultura da mandioca foram relatados por

Nuwamanya et al. (2010), ao avaliarem nove populações F_1 para teor de amido e amilose, onde concluíram que as médias entre geração e genitores foram muito semelhantes. Em outras culturas como o milho, a análise do tamanho médio dos grânulos de amido em 35 populações naturais, revelou que em termos médios, não houve diferença entre as populações para estas características, porém dentro de 28 populações, foram observados indivíduos que diferiram para o tamanho do grânulo de amido dentro de uma mesma população (CAMPBELL et al., 1996).

Apesar da ausência na diferença entre as médias entre genitores, gerações e interação entre geração x genitor, para a maioria das características, a amplitude das médias dos indivíduos dentro das progênies S_1 de mandioca, foi bastante elevada. A autofecundação, portanto, é um método para gerar indivíduos contrastantes para diversas características de interesse, de forma alternativa à fonte original do germoplasma. Em relação aos recursos genéticos de mandioca, alguns relatos têm demonstrado que o comprimento dos grânulos de amido de mandioca da América Latina pode variar de 4 a 40 μm , com média de 12 μm (CEBALLOS et al., 2007). Outros estudos no germoplasma do Brasil relataram variação no comprimento do grânulo de amido, de 8 a 14 μm (VASCONCELOS et al., 2017).

Além da variação natural, o tamanho dos grânulos de amido em mandioca também pode ser alterado com o uso de agentes mutagênicos associados à autofecundação das plantas mutantes (CEBALLOS et al., 2008). De acordo com os autores, após este procedimento, alguns genótipos de mandioca apresentaram grânulos de amido de menor tamanho (variação de 3 a 6 μm , com média 5 μm); em muitos casos associados com teor de amilose 30% superior aos genótipos não mutantes.

Também é possível obter genótipos de mandioca com variações significativas no tamanho do grânulo e nas propriedades de amido por meio de cruzamentos (NUWAMANYA et al., 2010), corroborando os resultados observados na autofecundação do presente estudo, na qual a distribuição do tamanho dos grânulos apresentou uma variação significativa entre os indivíduos S_1 . Em alguns casos, os indivíduos S_1 apresentaram até 70% dos grânulos menores que 15 μm , a exemplo dos indivíduos F0222-43, F1378-34 e F1662-62. A eficácia do uso de cruzamento entre genitores contrastantes para obtenção de genótipos com características específicas quanto à morfologia dos grânulos de

amido, também foi relatada em cevada, na qual o genótipo KK-2 foi selecionado entre 139 genótipos por apresentar uma redução na distribuição dos grânulos de amido acima de 15 μm e um aumento no comprimento nos grânulos de amido entre 5 a 15 μm (JAISWAL et al., 2014). Esses autores promoveram uma série de cruzamentos e avanço de gerações até F_5 e observaram a presença de três genótipos sem grânulos tipo C ($< 5 \mu\text{m}$) e cinco genótipos com grânulos acima de 15 μm de comprimento. Os fenótipos de amido incomuns exibidos pelas linhagens F_5 confirmaram que a distribuição de tamanho de grânulos de amido em cevada pode ser geneticamente alterada via melhoramento convencional (JAISWAL et al., 2014).

Em mandioca, ainda não existem trabalhos que expliquem efetivamente o controle genético e quais genes regulam o tamanho dos grânulos de amido. Todavia, na cultura do trigo, foi reportado que os genes SS (*starch synthase*) e GBSS (*granule-bound starch synthase*) e seus alelos, estão diretamente relacionados com o controle do tamanho do grânulo de amido no endosperma (ZHANG et al., 2010).

De modo geral, apesar da escassez de trabalhos que tenham como enfoque os fatores genéticos que controlam atributos morfológicos dos grânulos de amido, existem indícios que o tamanho dos grânulos seja um caráter poligênico, influenciado por efeitos genéticos aditivos (CAMPBELL et al., 1996; STODDARD, 2003). Segundo Freitas et al. (2016) em populações S_1 de mandioca, é possível obter-se ganhos de seleção quando o caráter é controlado principalmente por efeitos genéticos aditivos ou parcialmente dominantes. Assim, para o caráter tamanho do grânulo, o uso de populações S_1 pode ser uma alternativa viável para a obtenção de indivíduos com características distintas dos genitores (S_0), permitindo ganho genético com a seleção dos indivíduos transgressivos.

Segundo Freitas et al. (2016) a autofecundação em mandioca permitiu a obtenção de ganho de seleção para diversos caracteres agrônômicos, podendo chegar a 111%, 182%, 44%, 20%, 126% e 82% para produtividade de raízes, índice de colheita, teor de matéria seca, produtividade de amido e altura de planta, respectivamente. No presente trabalho, os ganhos genéticos mais significativos foram de 31%, 10%, 10% e 52% para aumento do grânulo até 19%, 10%, 10% e 31% para redução do grânulo, para os caracteres de área,

comprimento, perímetro do grânulo e número de grânulos, respectivamente. Para os caracteres relacionados à morfologia do grânulo, os ganhos de seleção foram muito semelhantes entre progênies. Todavia, entre os caracteres, os que possibilitaram maiores ganhos de seleção foram a área de grânulo com ganho variando de 18% a 31% e 15% a 19% para aumento e redução do tamanho de grânulo, respectivamente, e o número de grânulo de amido com ganho variando de 33% a 52% e 28% a 34% para aumento e redução do grânulo de amido, respectivamente. Os ganhos genéticos apresentados no presente trabalho foram menores que os reportados por Freitas et al. (2016), provavelmente devido ao fato de que as variâncias fenotípicas obtidas para os caracteres agrônômicos são maiores que para os caracteres relacionados à morfologia do grânulo de amido.

As correlações entre as características relacionadas à morfologia do grânulo de amido com elevadas magnitudes, positivas ou negativas, podem favorecer à adoção de estratégias de melhoramento mais eficazes para acelerar o desenvolvimento de novos genótipos. A elevada correlação positiva entre a área, perímetro e comprimento do grânulo de amido, indicam que nos trabalhos futuros, apenas uma destas características deve ser utilizada para otimizar a tomada de dados, pois certamente a seleção dos genótipos de maior interesse não será alterada. Por outro lado, a correlação entre o número de grânulos de amido com as outras três características (área, perímetro e comprimento dos grânulos), foi negativa e de magnitude mediana, indicando que a sua mensuração deve ser mantida em análises posteriores, por não apresentar informações complementares às demais características. Em outros estudos, o tamanho do grânulo de amido também apresentou correlação positiva com outras características relacionadas à qualidade e às propriedades do amido, a exemplo do teor de cinzas, lipídeos, poder de inchamento e solubilidade; além de correlações negativas com o teor de amilose, umidade e fibra bruta, materiais solúveis em água fria e também para pico de temperatura de gelatinização (NUWAMANYA et al., 2010).

A existência dessas correlações pode ser útil para nortear a seleção de indivíduos com características específicas para um determinado mercado. Por exemplo, atualmente, o amido de mandioca é muito utilizado pelo seu baixo teor de lipídeos, que resulta em uma ausência de sabor característico de cereais e assim não compromete o sabor final de diversos produtos industrializados

(BREUNINGER et al., 2009). Assim, o entendimento e o uso da correlação entre o tamanho de grânulo e o teor de lipídeos, pode contribuir para uma melhoria ainda maior neste atributo, de modo a direcionar a seleção de genótipos para indústria de alimentos.

Outras possíveis contribuições da pesquisa referem-se ao entendimento da correlação com o teor de amilose, considerando relatos anteriores de que genótipos com grânulos pequenos, tendem a apresentar elevado teor de amilose (CEBALLOS et al., 2008; NUWAMANYA et al., 2010), cujos principais usos industriais são para fabricação de produtos adesivos, papel, biopolímeros e alimentos de baixa digestibilidade. Por outro lado, grânulos maiores, são usados na indústria de alimentos associados a produtos que precisam de fácil gelatinização e que não congelem facilmente, tendo ainda ação estabilizadora e espessante em produtos alimentares e emulsionante para molhos, como exemplo para saladas (JOBILING, 2004). Outro processo muito influenciado pelo tamanho dos grânulos é a susceptibilidade enzimática, pois grânulos menores são mais rapidamente degradados por enzimas em comparação aos grânulos maiores (HUNG; MORITA, 2005; LINDEBOOM et al., 2004), que é particularmente importante para o processo de modificação química do amido por meio de enzimas. Assim sendo, genótipos com a maioria dos grânulos de menor tamanho, podem ser interessantes para auxiliar nesse processo (QI; TESTER, 2016).

No presente estudo não foram observadas correlações entre características agrônômicas e morfológicas de amido, o que indica que o processo de seleção de clones nas diferentes etapas do programa de melhoramento genético pode ocorrer sem causar nenhuma interferência na seleção para qualidade dos grânulos de amido. Portanto, este é um aspecto positivo, considerando que, em outras culturas, foram identificadas correlações indesejáveis entre atributos agrônômicos e de qualidade do amido, a exemplo a análise de 139 acessos de cevada, que revelou que os genótipos que apresentaram grânulos maiores ($<5 \mu\text{m}$), também apresentaram redução no peso de grãos e na concentração total de amido (JAISWAL et al., 2014). Os autores argumentaram que esses genótipos não são adequados para produção de grãos, todavia, os resultados obtidos são fundamentais para auxiliar no entendimento da base genética que controla o tamanho do grânulo de amido em cevada.

As correlações positivas observadas entre produtividade de amido x produtividade de raízes (0,99) e produtividade de amido x teor de matéria seca nas raízes (0,29), foram semelhantes aos resultados reportados por Gu et al. (2013), os quais estimaram correlação de 0,53 entre a matéria seca e teor de amido nas raízes de mandioca. Outras correlações associadas foram reportadas por Ntawuruhunga e Dixon (2010), cuja correlação positiva entre matéria seca nas raízes x área foliar (0,56), foi considerada de magnitude mediana e com consequências importantes para o processo de seleção de novas variedades de mandioca. Esses resultados estão de acordo com outros estudos para a cultura da mandioca, os quais apresentaram correlações entre diversas características agrônômicas, morfológicas e bioquímicas, com magnitudes e direção semelhantes às apresentadas no presente estudo (OJULONG et al., 2008; NTAWURUHUNGA; DIXON, 2010; GU et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

Mesmo havendo poucas informações sobre as características morfológicas do grânulo de amido, alguns estudos têm mostrado que esses caracteres são estáveis ao longo dos ambientes e anos de cultivo. De acordo com Gu et al. (2013), o tamanho médio e a distribuição do tamanho do grânulo de amido não sofreram alterações nos ambientes de cultivo ao analisarem sete cultivares de mandioca em diferentes regiões da África. Outros estudos demonstraram que tanto o tamanho médio, quanto a distribuição dos grânulos de amido, não foram alterados a partir do sexto mês de colheita após plantio, quando quatro cultivares de mandioca foram avaliados em diferentes períodos de colheita (SRIROTH et al., 1992).

Esses resultados são importantes e sugerem que, independente da época de colheita e/ou ambiente de cultivo, as características morfológicas do grânulo de amido, não serão alteradas. Portanto, a seleção de clones com características diferenciais de amido poderia apresentar uma maior estabilidade do caráter, ampliando as possibilidades de cultivo destes indivíduos, sobretudo em países com dimensões continentais como o Brasil.

Considerando os relatos de alta estabilidade das características associadas aos grânulos de amido de mandioca, é provável que as seleções realizadas dentro dos programas de melhoramento da cultura, nas diferentes fases, i.e., ensaio de *seedlings*, ensaios de avaliação clonal, ensaio preliminar, avançado, uniforme e regional de produção, sejam bastante acuradas de modo a permitir

que o ranqueamento dos indivíduos com fenótipos específicos desejados sejam estáveis nas diferentes fases de seleção, o que certamente contribui para melhorar a eficiência do melhoramento. Isso é particularmente interessante, pois existe uma necessidade de se selecionar os indivíduos da maneira mais acurada possível nas diferentes fases de seleção, sobretudo nas fases iniciais, onde o número de clones a serem avaliados é extremamente elevado, como ocorre na fase de *seedlings*. Nessa fase, a seleção fenotípica baseia-se em caracteres que possuam alta correlação e estabilidade entre gerações, de modo a reduzir significativamente o tempo de avaliação e os custos para implementação da fase clonal (ESUMA et al., 2016). Portanto, há um indicativo de que a seleção dos clones entre e dentro das progênies de mandioca considerando os atributos para qualidade de amido, pode ocorrer já na fase de *seedlings*.

CONCLUSÕES

A autofecundação em mandioca possibilitou uma ampla variabilidade genética para características morfológicas do grânulo de amido de forma alternativa à fonte original do germoplasma. A amplitude do tamanho dos grânulos encontrada permitiu obtenção de ganho genético com a seleção de indivíduos transgressivos

As características morfológicas do grânulo de amido possuem correlações entre si e não apresentam correlação com caracteres agrônômicos. Tal resultado é desejável, visto que é possível realizar o melhoramento de uma característica, sem que haja perdas em outras características de importância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREUNINGER, W. F.; PIYACHOMKWAN, K.; SRIROTH, K. Tapioca/cassava: production and use. **Starch: Chemistry and Technology**, v.3, p.541-568, 2009.

CAMPBELL, M. R.; LI, J.; BERKE, T. G.; GLOVER, D. V. Variation of starch granule size in tropical maize germplasm. **Cereal chemistry**, v. 73, p. 536-538, 1996.

CEBALLOS, H.; FREGENE, M.; LENTINI, Z.; SÁNCHEZ, T.; PUENTES, Y. I.; PÉREZ, J. C.; ROSERO, A.; TOFIÑO, A. P. Development and identification of high value cassava clones. **Acta Horticulturae**, v.703, p. 63-70, 2006.

CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C. A.; PÉREZ, J. C.; DIXON, A. G. O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant molecular biology**, v. 56, p. 503-516, 2004.

CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; DENYER, K.; TOFIÑO, A. P.; ROSERO, E. A.; DUFOUR, D.; FAHY, B. Induction and identification of a small-granule, high-amylose mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7215-7222, 2008.

CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; MORANTE, N.; FREGENE, M.; DUFOUR, D.; SMITH, A. M.; MESTRES, C. Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7469-7476, 2007.

ESUMA, W.; KAWUKI, R. S.; HERSELMAN, L.; LABUSCHAGNE, M. T. Diallel analysis of provitamin A carotenoid and dry matter content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Breeding science**, v. 66, p. 627-635, 2016.

FREITAS, J. P. X.; SILVAS, V. S.; OLIVEIRA, E. J. Inbreeding depression in cassava for productive traits. **Euphytica**, v. 209, p.137-154, 2016.

GU, B.; YAO, Q.; LI, K.; CHEN, S. Change in physicochemical traits of cassava roots and starches associated with genotypes and environmental factors. **Starch-Stärke**, v. 65, p. 253-263, 2013.

HALSEY, M.; OLSEN, K.M.; TAYLOR, N.J.; AGUIRRE, P.C. Reproductive Biology of Cassava (Crantz) and Isolation of Experimental Field Trials. **Crop Science**, v. 48, p. 49-58, 2008.

HUNG, V. P; MORITA, N. Effects of granule sizes on physicochemical properties of cross-linked and acetylated wheat starches. **Starch-Stärke**, v. 57, p. 413-420, 2005.

IGREJAS, G.; FAUCHER, B., BERTRAND, D.; GUIBERT, D.; LEROY, P.; BRANLARD, G. Genetic analysis of the size of endosperm starch granules in a mapped segregating wheat population. **Journal of cereal science**, v. 35, p. 103-107, 2002.

JAISWAL, S.; BÅGA, M.; AHUJA, G.; ROSSNAGEL, B. G.; CHIBBAR, R. N. Development of barley (*Hordeum vulgare* L.) lines with altered starch granule size distribution. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, p. 2289-2296, 2014.

JOBLING, Steve. Improving starch for food and industrial applications. **Current opinion in plant biology**, v. 7, p. 210-218, 2004.

KAWANO, K; FUKUDA, W. M. G; CENPUKDEE, U. Genetic and environmental effects on dry matter content of cassava root. **Crop Science**, v. 27, p. 69-74, 1987.

KAWEESI, T.; KYALIGONZA, V.; BAGUMA, Y.; KAWUKI, R.; MORAG, F. Inbreeding enhances field resistance to cassava brown streak viruses. **Journal of plant breeding and crop science**, v.8, p.138-149, 2016.

KAWUKI, R. S.; NUWAMANYA, E.; LABUSCHAGNE, M. T.; HERSELMAN, L.; FERGUSON M. E. Segregation of selected agronomic traits in six S₁ cassava families. **Journal Plant Breeding Crop Science**, v.3, p.154-160, 2011.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.579-588, 2007.

LINDEBOOM, NIENKE; CHANG, PETER R.; TYLER, ROBERT T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch-Stärke**, v. 56, p. 89-99, 2004.

MWETA, D.E.; LABUSCHAGNE, M.T.; KOEN, E.; BENESI, I.R.; SAKA, J. D. Some properties of starches from cocoyam (*Colocasia esculenta*) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) grown in Malawi. **African Journal of Food Science**, v.2, p.102-111, 2008.

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

NTAWURUHUNGA, P.; DIXON, A. G. Quantitative variation and interrelationship between factors influencing cassava yield. **Journal of Applied Biosciences**, v. 26, p. 1594-1602, 2010.

NUWAMANYA, E.; BAGUMA, Y. K.; EMMAMBUX, N.; TAYLOR, J.; PATRICK, R. Physicochemical and functional characteristics of cassava starch in Ugandan varieties and their progenies. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 1, p. 1-11, 2010.

OJULONG, H.; LABUSCHANGNE, M. T.; FREGENE, M.; HERSELMAN, L. A. Cassava clonal evaluation trial based on a new cassava breeding scheme. **Euphytica**, v. 160, p. 119-129, 2008.

OLIVEIRA, E. J.; DOS SANTOS, P. E. F.; PIRES, A. J. V; TOLENTINO, D. C.; SANTOS, V.S. Selection of cassava varieties for biomass and protein production in semiarid areas from Bahia. **Bioscience Journal**, v. 32, p.661-669, 2016.

OLIVEIRA, E. J.; RESENDE, M.D.V.; SANTOS, V.S.; FERREIRA, C.F.; OLIVEIRA, G.A.F.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA, L.A.; VILDOSO, C.I.A. Genome-wide selection in cassava. **Euphytica**, v. 187, p. 263-276, 2012

OLIVEIRA, E. J.; SANTANA, F. A.; OLIVEIRA, L. A.; SANTOS, V. S. Genetic parameters and prediction of genotypic values for root quality traits in cassava using REML/BLUP. **Genetics Molecular Research**, v. 13, p. 6683-6700, 2014.

QI, X; TESTER, R. F. Effect of native starch granule size on susceptibility to amylase hydrolysis. **Starch-Stärke**, v. 68, p. 807-8010, 2015.

R Core Team. “**R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria”. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>, Acesso em: 28/04/2017

RESENDE, M.D.V. **SELEGEN-REML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 359 p.

ROJAS, M. C.; PÉREZ, J. C.; CEBALLOS, H.; BAENA, D.; MORANTE, N.; CALLE, F. Analysis of inbreeding depression in eight S₁ cassava families. **Crop Science**, v.49, p.543-548, 2009.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v.9, p.671-675, 2012.

SOUZA, L.S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 817 p.

SRIROTH, K.; SANTISOPASRI, V.; PETCHALANUWAT, C.; KUROTJANAWONG, K.; PIYACHOMKWAN, K.; OATES, C. G. Cassava starch granule structure–function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. **Carbohydrate polymers**, v. 38, p. 161-170, 1999.

STODDARD, F. L. Genetics of starch granule size distribution in tetraploid and hexaploid wheats. **Crop and Pasture Science**, v. 54, p. 637-648, 2003.

VASCONCELOS, L. M.; BRITO, A. C.; CARMO, C. D.; OLIVEIRA, P. H. G. A.; OLIVEIRA, E. J. Phenotypic diversity of starch granules in cassava germplasm. **Genetics and molecular research**:, v. 16, p. 1-15, 2017.

WILSON, J. D.; BECHTEL, D. B.; TODD, T. C.; SEIB, P. A. Measurement of wheat starch granule size distribution using image analysis and laser diffraction technology. **Cereal Chemistry**, v. 83, p. 259-268, 2006.

ZHANG, C.; JIANG, D.; LIU, F.; CAI, J.; DAI, T.; CAO, W. Starch granules size distribution in superior and inferior grains of wheat is related to enzyme activities and their gene expressions during grain filling. **Journal of cereal science**, v. 51, p. 226-233, 2010.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os programas de melhoramento de mandioca vêm avaliando os efeitos que da endogamia exerce na cultura. Essa nova abordagem no melhoramento da mandioca tem possibilitado diversos avanços, como a expressão de genes recessivos relacionados ao amido, genótipos com aumento de nível de resistência a doenças e aumento de produtividade. Dentre as possibilidades que a endogamia oferece para o melhoramento de mandioca, o desenvolvimento de linhagens endogâmicas permite a exploração do vigor híbrido por meio de cruzamentos específicos de linhagens que podem contribuir significativamente para aumento da produtividade de raízes. O presente estudo teve o intuito de avaliar o nível de endogamia e a morfologia do grânulo de amido de indivíduos em progênies autofecundadas de mandioca, visando a seleção de indivíduos promissores.

A avaliação do nível de endogamia dos indivíduos de progênies S_1 permitiu identificar genótipos com elevada endogamia, sendo possível a seleção desses genótipos para novos ciclos de autofecundação, o que resultará em uma redução considerável de tempo para o desenvolvimento de linhagens endogâmicas.

Como as diferenças no tamanho médio de grânulo de amido podem influenciar nas propriedades físico-químicas do amido, este estudo permite concluir que, por meio da autofecundação, é possível explorar ampla variabilidade genética na morfologia do grânulo de amido observada em progênies S_1 para a identificação e seleção de indivíduos que possuem amidos com potencial para distintas aplicações industriais.