

KALINY VEIGA PESSOA DA SILVA

Caracterização citogenética e molecular de espécies e variedades do gênero *Manihot*

Recife - PE

2011

KALINY VEIGA PESSOA DA SILVA

Caracterização citogenética e molecular de espécies e variedades do gênero *Manihot*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Orientador: Dr. Reginaldo de Carvalho

Recife – PE

2011

KALINY VEIGA PESSOA DA SILVA

Caracterização citogenética e molecular de espécies e variedades do gênero *Manihot*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/2011.

Orientador: _____

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
Departamento de Biologia/UFRPE

Examinadores: _____

Prof. Dr. Péricles Albuquerque de Melo Filho
Departamento de Agronomia/UFRPE

Prof^a. Dr^a Maria Betânia de Oliveira Melo
Departamento de Bioquímica/ UFPE

Prof. Dr. Jailson Gitaí dos Santos Frazão
Departamento de Biologia /UAST

Terezinha de Jesus Rangel Câmara
Departamento de Biologia/UFRPE

Recife - PE

2011

DEDICATÓRIA

*“Tu és fiel senhor dia após dia
com bençãos sem fim.
Tua merce me sustenta e me guarda.
Tu és fiel Senhor, fiel a mim.”*

Dedico a minha família que me sustenta a cada passo, principalmente a meus pais, Ana Paula e Gilsom, que são a base forte do meu crescimento, meu motivo e minha razão para crescer mais e mais..

AGRADECIMENTOS

A Deus motivo maior de minhas vitórias, minha fé é minha certeza de que ele nunca me desampara.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), principalmente ao Departamento de Agronomia, seus professores e funcionários do Programa de Pós- Graduação em Melhoramento Genético de Plantas pelo apoio, estrutura oferecida e todos os conhecimento adquiridos. Em especial ao Professor Gerson Quirino por sua dedicação e empenho para com toda turma.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

A Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa), pelo apoio financeiro concedido e fornecimento de material para pesquisa, em especial ao Dr. Alfredo da Cunha Alves por sua contribuição.

A meu orientador, Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho, por seu incentivo, confiança, amizade e dedicação, essenciais para conclusão deste trabalho.

Aos membros da banca, Professores Maria Betânia, Tereza Câmara, Péricles de Albuquerque e Jailson Gitaí por todas as contribuições.

A pesquisadora Roseane Cavalcante por todo apoio e conhecimento transmitido.

A Cláudio Melo, por sua amizade e imensa contribuição que foi essencial para realização desse trabalho.

Aos meus colegas de turma do mestrado, em especial a Silvany Araújo, Georgia Vilela, Carliane Rebeca, Uiara Cavalcante e Morganna Pollinny, por terem dividido comigo momentos de muito estudo, de aperreio e de tensão. Mas principalmente pelos momentos de descontração e pela amizade construída ao longo do curso (Principalmente a Ny por nossas aventuras e momentos inesquecíveis).

Aos companheiros da equipe de Citogenética vegetal do Laboratório de Genética Bioquímica e Sequenciamento de DNA Genoma), Maria Isabel, Maria Luiza, Leonardo Lima, Sandrine Souza e Genialdo, pelo trabalho e conhecimento partilhados.

Aos demais amigos Genoma, em especial a Jacqueline Pereira, Carliane Rebeca, Iêda Oliveira, Mayara Mansur, Sérgio Lima, Jamilly Lopes, Karin Fontes e Camilla de Lima pela amizade e momentos de descontração.

A Maria Isabel, por sua dedicação, paciência, apoio, por seus ensinamentos e principalmente por seu companheirismo e constante demonstração de amizade essenciais para minha vida e para conclusão deste trabalho.

As amigas Andressa Priscilla e Patrícia Xavier, as quais não tenho palavras para agradecer por tamanha amizade e apoio.

As amigas e colegas da minha turma de graduação SB-3, Adriana Lima, Ivana Souza, Marília Luanda, Ana Carolina, Eliene Mariano, Cybelle Souza, Manuella Pamella, Aryêcha Arruda e Suelles Souza, por terem feito parte do início da minha caminhada e por estarem comigo até hoje.

A minha família, em especial aos meus pais, Ana Paula e Gilsom, pelo amor incondicional, pelo apoio e por tudo o que sou agora!

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Figuras	09
Lista de Tabelas	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO I	16
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1. <i>MANIHOT</i>	17
1.1.1. ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DOMESTICAÇÃO	17
1.1.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	18
1.1.3. SISTEMÁTICA E CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS	20
1.1.4. BANCOS DE GERMOPLASMAS	22
1.2. CITOGENÉTICA	23
1.2.1. CITOGENÉTICA DE <i>MANIHOT</i>	24
1.3. MARCADORES MOLECULARES	25
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO II – Análise citogenética convencional de acessos do gênero <i>Manihot</i> : Mitose e meiose.	33

RESUMO	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAIS E MÉTODOS	36
<i>Material vegetal</i>	36
<i>Pré-tratamento e Fixação</i>	36
<i>Análise convencional</i>	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO III – variabilidade genética entre acessos do gênero <i>Manihot</i> através do uso de marcadores moleculares ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)	43
RESUMO	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAIS E MÉTODOS	46
<i>Material Vegetal</i>	46
<i>Extração e quantificação de DNA Genômico</i>	46
<i>Amplificação por PCR e análise dos polimorfismos gerados</i>	46
<i>Análise estatística dos produtos amplificados por ISSR</i>	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Pág.
Figura 1: Maiores centros de diversificação do gênero <i>Manihot</i> .	17
Figura 2: Partes botânicas de <i>M. esculenta</i> . 1. Raíz; 2. Folhas; 3. Inflorescência; 4. Fruto e semente	21
 CAPÍTULO II	
Figura 1. Prometáfases, Metáfases e núcleos interfásicos de espécies de <i>Manihot</i> . A-C) <i>Manihot esculenta</i> ‘manipeba’, ‘Pornunça’ e ‘Aipim Bravo’; D) <i>M. glaziovii</i> ; E) <i>M. tomentosa</i> ; F) <i>M. irwini</i> ; G) <i>M. anomala</i> ; H) <i>M. dichotoma</i> ; I) <i>M. flabellifolia</i> ; J) <i>M. peruviana</i> . Setas apontam satélites. Observe na foto ‘a’ uma seção mostrando dois cromossomos satelitados associados no momento da expressão das RONS. Barra corresponde a 10um.	39
Figura 2. A) Metáfase mitótica de <i>M. leptophylla</i> . Observe o par satelitado com constrição secundária proximal (seta); B-C) anáfase I de <i>M. irwini</i> e <i>M. anomala</i> ; D-E) metáfase I com 18 bivalentes de <i>M. carthaginensis</i> e <i>M. flabelifolia</i> ; F) <i>M. esculenta</i> var. ‘Pornunça’ Tétrade com duas pequenas células adicionais; G-H) <i>M. esculenta</i> var. ‘Manipeba’, Políade em Meiose II e anáfase I apresentando irregularidade com a maioria dos cromossomos retardatários.	40
 CAPITULO III	
Figura 1. Produtos das ampliações ISSR-PCR em gel de agarose 1,2%. Oligonucleotídeos iniciadores UBC 823 e 810. M1- marcador DNA Ladder Plus 100pb; M2- marcador DNA Ladder Plus 1Kb; 1- <i>M. esculenta</i> var. ‘Mandiocaba’; 2- <i>M. noronhensis</i> ; 3- <i>M. esculenta</i> var. ‘Cruvela’; 4- <i>M. caerulescens</i> ; 5; <i>M. dichotoma</i> ; 6- <i>M. dichotoma</i> var. <i>ondulata</i> ; 7 <i>M. flabelifolia</i> ; 8- <i>Croton fruticosus</i> e 9- <i>C. rhamnifolius</i> .	52

Figura 2. Dendograma obtido pela análise das variações nas regiões ISSR das espécies pelo coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA. Sp1- *M. esculenta* var. 'Mandiocaba'; Sp 2- *M. noronhensis*; Sp3- *M. esculenta* var. 'Cruvela'; Sp4- *M. caerulescens*; Sp5; *M. dichotoma*; Sp6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; Sp7- *M. flabelifolia*; Sp8- *Croton fruticosus* e Sp9- *C. Rhamnifolius*. 52

Figura 3. Dendograma obtido pela análise das variações nas regiões ISSR das espécies pelo coeficiente de Simple matching e método de agrupamento UPGMA. Sp1- *M. esculenta* var. Mandiocaba; Sp 2- *M. noronhensis*; Sp3- *M. esculenta* var. Cruvela; Sp4- *M. caerulescens*; Sp5; *M. dichotoma*; Sp6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; Sp7- *M. flabelifolia*; Sp8- *Croton fruticosus* e Sp9- *C. Rhamnifolius*. 53

Figura 4 – Análise de PCO baseado no coeficiente de Jaccard em espécies do gênero *Manihot*. Sp1- *M. esculenta* var. Mandiocaba; Sp 2- *M. noronhensis*; Sp3- *M. esculenta* var. Cruvela; Sp4- *M. caerulescens*; Sp5; *M. dichotoma*; Sp6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; Sp7- *M. flabelifolia*; Sp8- *Croton fruticosus* e Sp9- *C. Rhamnifolius*. 54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III	Pág.
Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR utilizados nas ampliações, incluindo suas temperaturas de anelamento (T_m), número total de bandas, número total de locus, número de locus polimórficos e porcentagem de polimorfismo. Letras significando oligonucleotídeos degenerados: D = (A,G,T); Y= (C, T) e V= (A, C, G).	50
Tabela 2. Coeficiente de similaridade entre espécies do gênero <i>Manihot</i> e grupo externo <i>Croton</i> pelo método de Jaccard. 1- <i>M. esculenta</i> var. <i>Mandiocaba</i> ; 2- <i>M. noronhensis</i> ; 3- <i>M. esculenta</i> var. <i>Cruvela</i> ; 4- <i>M. caerulescens</i> ; 5; <i>M. dichotoma</i> ; 6- <i>M. dichotoma</i> var. <i>Ondulata</i> ; 7- <i>M. flabelifolia</i> ; 8- <i>Croton fruticosus</i> e 9- <i>C. rhamnifolius</i> .	51
Tabela 3. Coeficiente de similaridade entre espécies do gênero <i>Manihot</i> e grupo externo <i>Croton</i> pelo método Simple matching. 1- <i>M. esculenta</i> var. <i>Mandiocaba</i> ; 2- <i>M. noronhensis</i> ; 3- <i>M. esculenta</i> var. <i>Cruvela</i> ; 4- <i>M. caerulescens</i> ; 5; <i>M. dichotoma</i> ; 6- <i>M. dichotoma</i> var. <i>Ondulata</i> ; 7 <i>M. flabelifolia</i> ; 8- <i>Croton fruticosus</i> e 9- <i>C. rhamnifolius</i> .	51

RESUMO

O gênero *Manihot* pertence a família Euphorbiaceae, possui cerca de 98 espécies e é nativo das regiões tropicais das Américas, apresentando um grande centro de diversidade genética no Brasil. Cerca de 80% das espécies de *Manihot* ocorrem no país, exibindo amplo polimorfismo vegetativo e reunindo potencial para utilização em programas de melhoramento genético do gênero. A mandioca (*M. esculenta* Crantz) é a única espécie comercialmente cultivada, e dela se aproveita tanto a parte aérea como suas raízes reserva para consumo humano e animal, sendo utilizada na fabricação de farinha ou como parte da composição de diversos outros produtos e subprodutos. Análise cariotípica em células mitóticas ou meióticas em relação a homologia cromossômica, variações numéricas e estruturais, poliploidia e mecanismos evolutivos dos cariótipos podem fornecer informações úteis aos programas de melhoramento que visam a obtenção de cultivares melhoradas. Além disso, um estudo cariotípico em muitos casos contribui para o aumento no número de marcadores citológicos que quando relacionados a determinados aspectos horticulturais auxiliam na caracterização de cultivares. As espécies de *Manihot* são consideradas alotetraplóides, com $2n=36$ e um número básico $x=9$. Cruzamentos interespecíficos naturais podem ocorrer com certa frequência produzindo híbridos férteis ou não e, que, nos casos de infertilidade, essa característica pode não ser facilmente detectada por análise fenotípica. No entanto, acredita-se que estas espécies sofreram processo de diploidização ao longo da evolução, apresentando hoje um comportamento meiótico típico de diplóide. Este trabalho realizou a análise mitótica e meiótica em nove espécies do gênero *Manihot*, a fim de confirmar a estabilidade cariotípica descrita na literatura. Para isso, três variedades de mandioca e oito espécies silvestres foram analisadas. O estudo revelou uma forte estabilidade do cariótipo mitótico entre as espécies quanto ao número e morfologia cromossômica, o tamanho médio dos cromossomos de 1,75 e máximo de dois pares de satélites. A meiose foi regular em espécies selvagens e irregular em variedades de 'manipeba' *M. esculenta*, mostrando univalentes, bivalentes e trivalentes na metáfase, anáfase I, mostrando o comportamento típico de uma meiose triplóides e parcialmente irregular em 'pornunça', produzindo políades na microsporogênese. Adicionalmente foi realizado um estudo molecular com marcador ISSR (Simple sequence internal). Foram observados polimorfismos da ordem de 89,7% entre os loci das espécies estudadas mostrando uma ampla variabilidade genética entre as espécies do gênero que podem ser fontes importantes de genes a serem empregados em programas de melhoramento da espécie cultivada. Entretanto, como esperado, houve uma grande similaridade genética entre as variedades da espécie *M. esculenta* em relação as espécies silvestres.

Palavras chave: Cromossomos mitóticos, poliploidia, meiose.

ABSTRACT

The *Manihot* genus belongs to Euphorbiaceae family, has about 98 species and native to tropical regions of the Americas, with greatest diversity center in Brazil, with 80% of *Manihot* species, showing a large vegetative polymorphism and a potential source for cassava breeding programs. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is the only commercially cultivated species, with the shoots and the tuber roots used for both human food and animal feed. Cassava roots are also used in the manufacture of flour or in the composition of other products. Karyotypic analysis in mitotic or meiotic cells concerning to chromosomal homology, numerical and structural variations, polyploidy and evolution mechanisms of the karyotypes can provide useful information for breeding programs aimed at achieving improved cultivars. In addition, a karyotype study in many cases contributes to the increase cytogenetic markers that while certain aspects related to horticultural assist in the cultivars characterization. *Manihot* species are considered allotetraploid, with $2n=36$ chromosome and $x=9$ as basic number. Natural interspecific crosses can be found frequently, making in some cases infertile hybrids. Infertility is not easily detected using phenotypic analysis. However, it is believed that these species undergone diploidization process along the evolution, now showing a meiotic behavior of a diploid. This work aimed the mitotic and meiotic analysis in nine species of the genus *Manihot* in order to confirm the karyotypic stability described at literature data. Three varieties of cassava and eight wild species were analysed. The analysis revealed strong mitotic stability among species regarding the number and chromosome morphology, average size of chromosomes of 1.75 and maximum of two pairs of satellites. The meiosis was regular in wild species and irregular in varieties of *M. esculenta* 'manipeba', showing univalent, bivalent and trivalent at metaphase-anaphase I, showing typical behavior of a triploid and partly irregular meiosis in 'pornunça', producing polyads in microsporogenesis. An additional study was performed with molecular marker ISSR (Inter simple sequence repeat). Polymorphism was observed in 89.7% among the locus of the species, but as expected, there was a great genetic similarity between varieties of *M. esculenta* cultivated for the wild species.

Keywords: Mitotic chromosomes, polyploidy, meiosis.

INTRODUÇÃO

O gênero *Manihot* (Euphorbiaceae) possui 98 espécies identificadas, sendo o Brasil central (Sul de Goiás e Oeste de Minas Gerais), considerado o maior centro de diversificação, seguido do Sudeste do México, do Nordeste do Brasil, do Sudeste do Mato Grosso e a Bolívia (NASSAR, 2000). É originário do continente americano distribuindo-se desde os Estados Unidos até a Argentina. De todas as espécies do gênero, *M. esculenta* Crantz (macaxeira ou mandioca) tornou-se particularmente importante, por ser uma das culturas alimentares mais difundidas no mundo, uma vez que se aproveita tanto a parte aérea como as raízes reservas, seja para o consumo humano ou animal, bem como parte da composição de diversos produtos e subprodutos. Sua utilização é especialmente intensa em países em desenvolvimento, onde as deficiências calóricas e a subnutrição são generalizadas (FUKUDA, 1996). Neste contexto, a mandioca se destaca por sua importância nutricional e social, como elemento tradicional da dieta da população rural e urbana.

Todas as espécies do gênero analisadas citogeneticamente até o momento apresentam cariótipo com $2n=36$, cromossomos pequenos e muito similares de difícil análise por meio de técnicas convencionais (CARVALHO e GUERRA, 2002). Com relação ao comportamento meiótico as espécies apresentam na maioria dos casos meiose regular sem alterações significativas durante a divisão (NASSAR, 2002). Contudo, a utilização da técnica de citogenética molecular como a hibridização in situ fluorescente (FISH), por exemplo, vem auxiliando na identificação de marcadores cromossômicos úteis e na identificação de modificações na constituição genômica que permitam a distinção entre as espécies e variedades cultivadas (CARVALHO e GUERRA, 2002; BRASILEIRO – VIDAL, et al., 2009).

Uma outra alternativa na caracterização ou distinção entre espécies e variedades cultivadas são os marcadores moleculares. Estes são abundantes nos genomas vegetais comportando-se muitas vezes como ferramentas rápidas e eficazes para o estudo dos diferentes genomas, uma vez que detectam polimorfismos diretamente ao nível do DNA, não sofrendo influência ambiental e sendo independentes do estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Com o uso de técnicas moleculares, as espécies de *Manihot* foram analisadas através de marcadores como RAPD (Random Amplified

Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) com o intuito de estudar o grau de relação genética entre a mandioca cultivada e espécies de ocorrência natural (SECOND, 2000). Sardos et al. (2009) confirmaram a condição triploide em dois clones de mandioca 'Briskit' e 'Mariango-red' com base na observação de alelos sem triplicata em dois loci de microssatélites. Os marcadores microssatélites (*Simple Sequence Repeats - SSR*) apresentam caráter co-dominante, podendo diferenciar homozigotos dos heterozigotos.

Diversas técnicas baseadas em PCR utilizando marcadores moleculares estão disponíveis atualmente, principalmente as que não requerem grandes quantidades de DNA nem mesmo de informações prévias sobre o genoma alvo. O marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) apresenta o perfil de marcador não ancorado, multiloci além de gerar um bom padrão de DNA fingerprinting. Pode ser utilizado com eficiência na análise da diversidade genética de *Manihot*, já que o mesmo tem se mostrado eficaz na caracterização da diversidade genética de outras espécies (POCZAI et al., 2008), bem como na identificação de acessos e cultivares agronomicamente importantes para o melhoramento genético (ISSHIKI et al., 2008; WILKINSON, 2000).

Com base no exposto o presente trabalho se propôs a realizar uma análise mitótica e meiótica por meio da técnica de coloração convencional, tomando como acessos, variedades da mandioca cultivada (*M. esculenta* Crantz) e outras espécies do gênero *Manihot*, a fim de caracterizar os cariótipos. Além de, realizar um estudo molecular com marcadores ISSR objetivando comparar o nível de diversidade genética intra e interespecífica.

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- *MANIHOT*

2.1.1- ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DOMESTICAÇÃO

O gênero *Manihot* Miller (Euphorbiaceae Juss) é originário do continente americano distribuindo-se desde os Estados Unidos até a Argentina (ROGERS e APPAN, 1973). Possui 98 espécies, sendo o Sul de Goiás e Oeste de Minas Gerais, considerados o maior centro de diversificação, seguidos do Sudeste do México, Nordeste do Brasil, Sudeste do Mato Grosso e a Bolívia, respectivamente (Figura.1). Muitas espécies ocorrem também na Amazônia (OLSEN e SCHAAL, 2001).



Modificado de: <http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=7823>

Figura 1: Maiores centros de diversificação do gênero *Manihot*.

Este gênero apresenta pelo menos dois centros de especiação: um na costa Oeste do México e Guatemala e outro no planalto central do Brasil (VALLE, 1991). NASSAR, 1978, considerou que o Brasil central seria o centro principal de diversidade das espécies, pela idade antiga da região e também por serem encontradas nela espécies com características mais primitivas *M. stipulares*, *M. pussilla*, *M. longepetiolata* com inflorescências dióicas e *M. stricta*, *M. purpúreo-costata* e *M. salicifolia* com folhas sésseis não lobadas.

A mandioca foi domesticada visando a produção de raízes a partir de espécies silvestres como *M. flabelifolia* e *M. peruviana* (ALLEM, 1987). Possivelmente, a domesticação ocorreu simultaneamente em diferentes partes dos trópicos. Estudos mais recentes indicaram os Estados do Tocantins, Goiás, Mato grosso, Rondônia e Acre como possíveis regiões brasileiras de início da domesticação da mandioca e, após serem domesticadas pelas populações indígenas americanas, as espécies de *Manihot* foram introduzidas no continente africano e nas Filipinas, levadas pelos portugueses e chineses no século XVI com o advento das navegações (OLSEN e SCHAAL, 1999). Da África se espalharam nas mãos de comerciantes por todas as regiões do continente asiático (ROGERS e APPAN, 1973).

2.1.2- IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A mandioca exerceu um papel fundamental para as populações nativas da América do Sul, foi a principal fonte de carboidratos para as populações pré colombianas, sendo cultivada desde então em nível de subsistência e também como produto comercial. Atualmente, identificadas 98 espécies do gênero *Manihot* a mandioca, *M. esculenta* Crantz, é a única espécie cultivada para o consumo de suas raízes reserva (FOKUDA, 1999). Em função do tipo de raiz a mandioca pode ser classificada em: 1) de "mesa" ou mansa é comercializada na forma cozida in natura não tem sabor amargo e contém baixo teor de glicosídeos cianogênicos e 2) para a indústria ou brava transformada principalmente em farinha e fécula, a mandioca brava tem sabor amargo, com alto teor de glicosídeos cianogênicos (VALLE et al., 2004).

Em 2009 a produção mundial de raiz, farinha e fécula de mandioca alcançou 242 milhões de toneladas. Os destaques foram para a Nigéria, com 45 milhões de toneladas, Tailândia, 30,1 milhões de toneladas e Brasil, responsável por 26,6 milhões de toneladas. No Brasil, em 2010 a receita com as exportações de raiz e derivados de mandioca superou os cinco milhões de dólares (IBGE, 2010). Devido a sua importância sócio-econômica, a mandioca vem obtendo um crescimento médio anual de 2,6% e passando de 97 milhões para 173 milhões de toneladas nos últimos anos. O mercado internacional é dominado por países como a Tailândia que detém mais de 50% das exportações mundiais de mandioca e seus derivados. Contudo, as oportunidades de exportações só começaram a ter um aumento graças ao crescimento e modernização da indústria de fécula e amidos modificados e ao estabelecimento das empresas processadoras de mandioca pré-cozida congelada (CARDOSO e GAMEIRO, 2006).

A mandioca é cultivada em todo o território nacional, destacando-se a Região Nordeste como produtora e também consumidora de suas raízes. Nas Regiões Norte e Nordeste quase toda a produção é usada na fabricação de farinha e para consumo direto das raízes seja para alimentação humana ou animal, no entanto nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste a raiz é utilizada para outros fins, principalmente para produção de fécula que junto com seus produtos derivados, têm competitividade crescente no mercado de amiláceos para a alimentação humana, ou como insumos em diversos ramos industriais tais como o de alimentos embutidos, embalagens, colas, mineração, têxtil e farmacêutica. Muitas espécies de *Manihot* são produtoras de látex, entre elas, a *M. glaziovii* Muell e a *M. caerulescens* Pohl, estas foram usadas durante muitos anos para produção de borracha (CARDOSO e GAMEIRO, 2006).

Com grande potencial de resistência ao estresse hídrico a mandioca serve principalmente como base alimentar para populações de baixa renda em todo o mundo. Ocupa o quarto lugar como fonte de carboidratos nos trópicos, superada apenas pelo arroz, cana-de-açúcar e milho. É cultivada principalmente a nível de subsistência por pequenos agricultores. No entanto existem produtores com áreas plantadas superiores a 2000ha, em solos de menor fertilidade em rotação com culturas como soja, milho e pastagens (ALVES et al., 2008).

2.1.3- SISTEMÁTICA E CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS

A família Euphorbiaceae Juss é formada por árvores, arbustos e ervas e tem como característica principal a presença de látex em suas espécies. Amplamente distribuída no globo, com maior diversidade nas regiões tropicais, a família é composta por cerca de 307 gêneros e aproximadamente 6.900 espécies, com destaque para os gêneros *Euphorbia* (2.000 sp), *Croton* (750), *Phyllanthus* (500), *Acalypha* (400), *Glochidion* (300), *Macaranga* (250), *Antidesma* (150), *Tragia* (150), *Jatropha* (150) e *Manihot* (98) (JUDD et al., 1999).

Pertencente a subfamília Crotonoideae, o gênero *Manihot* Miller têm reconhecidas 98 espécies distribuídas em 19 seções, das quais 13 ocorrem no Brasil (ROGERS e APPAN, 1973), estas são perenes, crescem em áreas abertas e desenvolvem-se na maioria dos solos, desde calcários e bem drenados até os poucos profundos e pedregosos. Variam quanto ao padrão de crescimento, podendo ocorrer como arbustos, subarbustos e árvores (SOARES, 1995).

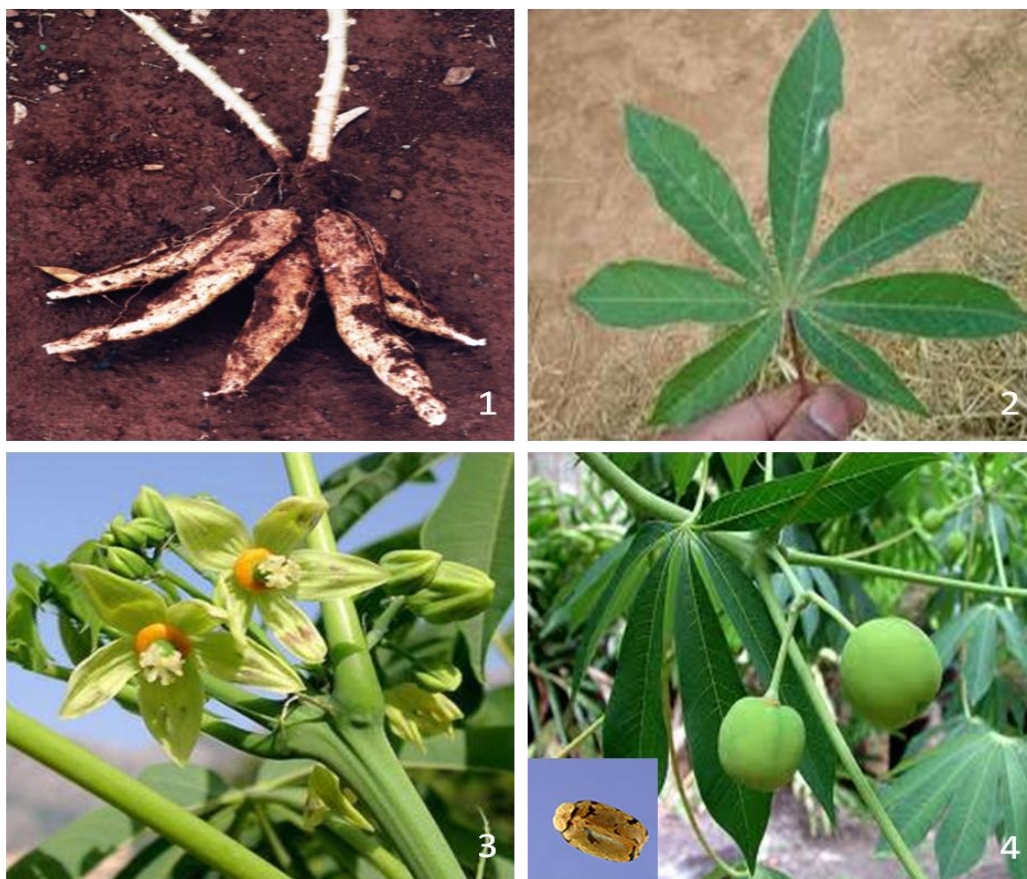
A mandioca possui uma raiz pivotante principal que origina quatro ou mais raízes secundárias (Figura 2.1), as raízes reserva têm distribuição e profundidade variável, apresentando uma película externa fina que pode apresentar diversas cores. As raízes das espécies cultivadas fornecem uma grande quantidade de carboidratos contendo também amido e concentrações variadas de ácido cianídrico (LEÓN, 1987).

As folhas de *Manihot* são decíduas, duram cerca de dois meses dependendo da variedade e das condições climáticas. O pecíolo apresenta coloração e tamanho variável, com tonalidades variando desde verde a verde- amarelada, vermelha e roxa. Apresentam lâminas coriáceas ou membranáceas divididas em cerca de 3 a 11 lobos (Figura 2.2), a forma varia de lanceoladas, obovada, ovada e reniforme (SOARES e SALVIANO, 2000).

As inflorescências são do tipo panícula ou racemo. As flores masculinas e femininas são separadas com coloração variada dependendo da espécie. Na parte superior da inflorescência estão as flores estaminadas, monoclamídeas, desprovidas de corola apenas com o cálice que é formado por cinco sépalas imbricadas. Na

parte basal estão posicionadas as flores femininas, estas são maiores do que as masculinas. O ovário é súpero, trilocular, com um óvulo em cada lóculo, os estiletos, em número de três, são curtos e presos entre si. Na extremidade dos estiletos encontram-se o estigma, bem desenvolvido, largo, carnoso e ondulado (Figura 2.3) (ROGERS e APPAN, 1973).

O fruto é esquizocarpáceo, com formação de cocas e presença do carpóforo, tem deiscência septicida e loculicida, de superfície geralmente lisa, podendo haver espécies com frutos alados. A maturação dos frutos dura cerca de seis meses quando se abrem e expulsam as sementes a grandes distâncias das plantas chegando a atingir até 30 metros. As sementes são típicas das euforbiáceas com superfície lisa e brilhante coberta por manchas escuras e carunculadas (Figura 2.4) (CARVALHO e FUKUDA, 2006).



<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol>

Figura 2: Partes botânicas de *M. esculenta*. 1. Raíz; 2. Folhas; 3. Inflorescência; 4. Fruto e semente.

2.1.4 BANCOS DE GERMOPLASMAS

Os bancos de germoplasmas funcionam como unidades mantenedoras do material genético disponível. Os bancos podem ser considerados: in vivo, que podem ser divididos em dois grupos: os bancos ativos de germoplasma conhecidos com in situ, que tratam do trabalho com germoplasma mantido no seu hábitat natural, e aqueles que mantidos fora do seu habitat natural em coleções, chamados ex situ ; Já a outra categoria de bancos de germoplasma corresponde aos bancos in vitro resultantes do cultivo de meristemas ou ainda, banco de sementes genéticas. No Brasil, a maioria das coleções de variedades de mandioca e espécies de *Manihot* estão mantidas ex situ, apesar de constituir uma das formas que mais precisam de manutenção com investimentos de mão de obra, além de oferecer maiores riscos de perdas principalmente por ataques de pragas como a broca e os ácaros. Já a conservação in vitro constitui uma das formas mais grandemente utilizadas de preservação do germoplasma de mandioca, permitindo manter um maior número de indivíduos ocupando uma pequena área (ALVES et al., 2008).

Em decorrência da facilidade de polinização cruzada, da heterozigosidade característica das espécies de *Manihot* e da deiscência abrupta dos frutos a mandioca possui uma gama de genótipos diferentes. O Brasil é portador de uma ampla variabilidade genética do gênero *Manihot*, mantida em coleções de trabalho e bancos ativos de germoplasma distribuídos em todo o país. A conservação do germoplasma de mandioca é fundamental para reduzir a chamada 'erosão genética', mantendo toda variabilidade disponível da espécie, com a maior integridade possível, para os trabalhos de melhoramento com a cultura (ROCA et al., 1991; ALVES et al., 2008).

A caracterização genética dos diferentes acessos de bancos de germoplasma é uma importante fonte de dados para melhoristas e conservacionistas, uma vez que permite um melhor estudo da composição genética além de permitir uma seleção mais eficiente dos genótipos a serem utilizados em programas de melhoramento genético. Isso facilita a detecção da variabilidade genética para fins de melhoramento convencional ou com fins biotecnológicos, bem como programas de conservação e reflorestamento (BENKO-ISEPPON, 2001; SARDOS et al., 2009). Os acessos de mandioca são caracterizados basicamente por diferenciação botânica,

analisando caracteres como descritores de raiz, caule e folha (FUKUDA et al., 1997). Além dos caracteres morfológicos, os moleculares e também citogenéticos, são importantes na diferenciação de genótipos de *Manihot*, estes permitem identificar com maior segurança acessos duplicados nos bancos (SILVA et al., 2010).

2.2- CITOGENÉTICA

O uso de técnicas citogenéticas tem se mostrado uma eficiente metodologia para caracterização de vários grupos vegetais, diferentes espécies, importantes economicamente já tiveram seu cariótipo estudado através da citogenética clássica, avaliando número, tamanho e morfologia cromossômica além do comportamento meiótico (CARVALHO e GUERRA, 2002; CARVALHO et al., 2005). A citogenética vegetal contribui de forma acentuada para o melhoramento de plantas, tendo em vista identificar alterações cromossômicas mitóticas e meióticas, analisar híbridos e seus descendentes, realizar estudos relacionados a transferências de genes entre espécies nativas e cultivadas, identificar alterações cromossômicas ocorrentes no cultivo in vitro, além de análises das origens e reconstruções de poliplóides (STACE, 2000; GUERRA, 2004).

O estudo do comportamento meiótico das espécies constitui-se em uma ferramenta importante para programas de melhoramento, podendo ser realizado através da citogenética convencional utilizando corantes como giemsa, hematoxilina, carmim e orcéina que coram tanto os cromossomos meióticos quanto os mitóticos por inteiro, assim como núcleos interfásicos (GUERRA et al., 1997; FEITOZA et al., 2009). Segundo Defani-Scoarize et al. (1995), o sucesso da hibridação, tanto intra quanto interespecífica, em termos genéticos, é determinada por uma meiose regular, para que resulte na formação de gametas viáveis. O conhecimento da fertilidade das espécies envolvidas num programa de hibridação interespecífica é importante para que o melhorista tenha chance de ser bem sucedido nos cruzamentos a serem realizados (MARTINS et al., 2010; VEIGA et al., 2009).

A poliploidia, ou seja, a existência de mais de dois genomas no mesmo núcleo, é de ocorrência comum nas plantas, tendo desempenhado um importante papel na origem e evolução de plantas silvestres e cultivadas (SCHIFINO-WITTMANN et al., 2004). A ocorrência da poliploidia espontânea foi constatada, no gênero *Manihot*, por

Hahn et al. (1992) em um híbrido artificial entre *M. esculenta* e *M. epruinosa* e por Carvalho et al. (1999) em um triplóide natural, $2n=54$ de *M. esculenta* variedade 'Manipeba'. Segundo Sardos et al. (2009) a mandioca é uma cultura submetida a uma forte seleção humana, e o estabelecimento de triplóides envolve a seleção e manutenção por parte dos agricultores.

De acordo com Guerra (1988) a poliploidia é o tipo de variação cromossômica que predomina na evolução vegetal. Mable (2003) afirmou que a poliploidia encontra-se presente em 95% das pteridófitas e em até 80% das angiospermas. Cerca de 40% das espécies cultivadas apresentam algum grau de poliploidia, como alfafa (*Medicago sativa*), algodão (*Gossypium hirsutum*), batata (*Solanum tuberosum*), batata doce (*Ipomoea batatas*), café (*Coffea arabica*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), fumo (*Nicotiana tabacum*), morango (*Fragaria ananassa*), abacaxi (*Ananas comosus*) e trigo (*Triticum aestivum*).

2.2.1- CITOGENÉTICA DE MANIHOT

Mesmo sendo muito cultivada a mandioca é ainda pouco estudada do ponto de vista genético e citogenético. Análise sobre o conteúdo de DNA em *M. esculenta* revelou que a mandioca é uma espécie diplóide com base em 1,67 pg de DNA e um complemento haplóide de 772 Mb (AWOLEYE et al., 1994). Por outro lado, a citogenética tem apontado uma origem alotetraplóide para *Manihot* com base em $x=9$ e número diplóide $2n=36$ encontrado em todas as espécies do gênero analisadas até agora (UMANAH e HARTMANN, 1973; CARVALHO E GUERRA, 2002), com exceção da *M. esculenta* que apresenta número cromossômico $2n=54$ descrito por Carvalho et al., (1999). O número cromossômico da mandioca, $2n=36$, foi determinado inicialmente por Graner (1935), e posteriormente confirmado por outros autores.

Contudo, acredita-se que as espécies tenham sofrido processo de diploidização ao longo da evolução apresentando atualmente um comportamento cromossômico típico de um diplóide. A estabilidade do cariótipo do gênero foi evidenciada através da técnica de hibridização in situ utilizada na análise de 34 acessos de *Manihot*. Os resultados obtidos mostraram que todos os cariótipos apresentavam quatro cromossomos com uma única sequência rica em CG marcada

(blocos CMA₃⁺) na região subterminal e seis sítios de DNAr 45S, dos quais quatro foram encontrados na mesma posição que os blocos CMA₃⁺, demonstrando uma grande semelhança cariotípica entre os acessos. Além disso, os acessos apresentaram comportamento meiótico regular típico de diplóides, exceto no caso dos poliplóides (CARVALHO e GUERRA, 2002; VEIGA et al., 2009).

2.3- MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são ferramentas bastante utilizadas em estudos genéticos, podendo detectar polimorfismo diretamente ao nível do DNA, independente da idade do organismo, do tecido analisado e das influências ambientais (OLIVEIRA et al., 2007). Estes são baseados na amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase e têm sido grandemente empregados nos programas de melhoramento de plantas. Os marcadores moleculares podem ser empregados como ferramenta auxiliar, por exemplo, no estudo da diversidade genética de populações, taxonomia, ecologia, avaliação do potencial dos recursos genéticos disponíveis e na construção de mapas genéticos e suas associações com características agrônômicas entre outras aplicações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; BENKO-ISEPPON et al., 2003).

Diferentes tipos de marcadores são utilizados em programas de melhoramento de plantas, diferenciando-se entre si quanto ao custo de aplicação, facilidade de uso e consistência dos resultados (BORÉM e CAIXETA, 2006). Dentre os marcadores moleculares amplamente utilizados em estudos genéticos de plantas, pode-se destacar o RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*), e SNPs (*Single Nucleotides Polymorphisms*), isoenzimas entre outros (ZÁRATER et al., 2005).

Os ISSR são marcadores multiloci e arbitrários produzidos por amplificação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores (Olii) de microsatélites de 16 a 25pb. (STAUB et al., 1996; GUPTA e VARSHNEY, 2000). Para utilização desses marcadores não se faz necessário o conhecimento prévio do genoma, são menos específicos quando comparados ao microsatélite e são reproduzíveis com a

vantagem de gerar grandes quantidades de bandas (GUPTA et al., 1994). Esses marcadores são ferramentas rápidas e precisas na identificação de polimorfismos entre genomas para estudos filogenéticos, taxonômicos e de melhoramento vegetal (SALIMATH et al., 1995). Os marcadores ISSR foram utilizados com sucesso para fins de caracterização e estimativa da diversidade genética em culturas como cacau, batata, trigo, feijão e outras (PROVOST E WILKINSON, 1991; NAGAOKA E OGIHARA, 1997; LANHAN E BREMAN, 1998; CHARTERS e WILKINSON, 2000; JOSHI et al., 2000; AJIBADE et al., 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AJIBADE, S.R., WEEDEN, N.F.; CHITE, S.M., Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, v. 111, p 47–55, 2000.

ALLEM, A.C. *Manihot esculenta* is a native of the Neotropics. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.71, p.22–24,1987.

ALVES, A.A.C.; DITA, M.A.; FARIAS, A.R.N.; SILVA, A.F.; BELLOTTI, A.; FREGENE, M. Pré-melhoramento de mandioca: Utilização de espécies silvestres de *Manihot* como fonte de resistência a estresses bióticos e abióticos. Em: Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, 2. 25-28 Novembro 2008, Brasília. **Anais do II Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos**, Brasília, Brasil: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), p.78, 2008.

AWOLEYE, F.; DUREN, M.V.; DOLEZEL, J.; NOVAK, F.J. Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. **Euphytica**, v.76, p.195-202, 1994.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; MELO-OLIVEIRA, M.B.; CARVALHEIRA, G.M.G. ; GUERRA, M. . Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. **Micron**, v. 40, p. 851-859, 2009.

BENKO-ISEPPON, A.M. Estudos moleculares e citogenéticos no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. **EMBRAPA Documentos 56**, p.327-332, 2001.

BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MÜHLBAUER, F.; KAHL, G. Markers closely linked to Fusarium resistance genes in chickpea show homology to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosome 5 and 1. **Theoretical and Applied Genetics**, n.103, p.379-286, 2003.

BORÉM, A.; CAIXETA, T.C. **Marcadores Moleculares**. 1º Edição. Viçosa/MG: Editora UFV. 2006, 374p.

CARDOSO, C. E. L.; GAMEIRO, A. H. Caracterização da cadeia industrial. In: SOUZA, L. S.; FARIAS, A. R.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. (Ed.). Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, cap. 1, p. 19-40. 2006.

CARVALHO, P. C. L. e FUKUDA, W. M. G. Estrutura da planta e morfologia. In: SOUZA, L. S.; FARIAS, A. R.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. (Ed.). Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, cap. 6, p. 126-137. 2006.

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

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

CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W.S.; BRASILEIRO VIDAS, A.C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v.109, n.1, p.276-282, 2005.

CHARTERS. Y.M.; WILKINSON, M.J. The use of self-pollinated progenies as “In-groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 160-166. 2000.

DEFANI-SOARIZE, M.A.; PAGLIARINI, M.S. e AGUIAR, C.G.. Causes of partial male sterility in an inbred maize line. **Cytologia** , v.60, p.311-318, 1995.

FEITOZA, L. L.; MARTINS, M. I. G.; CASTRO, A. A. J. F.; FÉLIX, L. P. e CARVALHO, R. Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**. V, 286, 199-208. 2009.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA-CENARGEN**, 3. Ed, 220p. 1998.

FUKUDA, W.M.G. Melhoramento da mandioca. In: BOREM, A. (ed.), **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: UFV, p. 409-428. 1999.

FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S. O de.; PORTO, M.C.M. Caracterização e avaliação de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMP, 161p.(**Catalogo**). 1997.

GRANER, E.A. Contribuição para o estudo citológico da mandioca. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, USP, Piracicaba, p.28, 1935.

GUERRA, M.S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. 1988.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K., SOARES FILHO, W.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Genetics and Molecular Biology**, v.20, p. 489-496, 1997.

GUERRA, M. FISH – Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade **Brasileira de Genética**, 184p. Ribeirão Preto, 2004.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**. v.89, p.998-1006. 1994.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v. 113,n. 03, p. 163-185, 2000.

HAHN, S.K.; BAI, V.K.; ASIEDU. Spontaneous somatic tetraploids in cassava. **Japanese journal of breeding**, v.42, p.303-308, 1992.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acessado em 15 de outubro de 2010.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M.R. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**. v.117, p.186-190, 2008.

JOSHI, S.P.; GUPTA, V.S.; AGGARWAL, R.K.; RANJEKAR, P.K.; BRAR, D.S.. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1311–1320, 2000.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A. STEVENS, P.F. A phylogenetic approach. **Plant systematic**, Sunderland: Sinauer. 1999.

LEÓN, J. **Botánica de los Cultivos Tropicales**. San José: IICA, 445p. 1987.

MABLE, B. K. Breaking down taxonomic barriers in polyploidy research. **Plant Science**. v.8, n.12, 2003.

MARTINS, K. C. T.; PEREIRA, N. S.; I SOUZA, S. A. M.; COSTA, F. R. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.8, p.1746-175, 2010.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.597-602. 1997

NASSAR, N.M.A. Genetic resources of cassava: chromosome behavior in some *Manihot* species. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**. v.38, p.135-137.1978.

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

NASSAR, N.M.A. Cytogenetics and Evolution of cassava (*M. esculenta* Crantz). **Genetics and Molecular Biology** 23:4,1003-1014. 2002.

OLIVEIRA, M. S. P.; AMORIM, E. P.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1645-1653, 2007.

OLSEN, K.M.; SCHAAL, B.A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences from the United States of America**, v. 96, p. 5586-5591, 1999.

OLSEN, K.M. e 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, p.131-142, 2001.

POCZAI, P., TALLER, J., SZABÓ, I.: Analysis of phylogenetic relationships in the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**. v.275, p.59-67, 2008.

PROVOST, A; WILKINSON, M.J. A newsystem of comparinmg PCR primers applied to ISSR fringerprint of poptato cultivar. **Theoretical and applied genetics**, v. 98, p. 107-112. 1991.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHÁVES, R. Métodos de conservación in vitro Del germoplasma. In: ROCA,W.M.; MROGINSKI, L.A. . **Cultivo de tejidos en La agricultura**. Cali, Colombia: [s.n.] p.696-713. 1991.

ROGERS, D.J.; APPAN, S.G. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae). **Flora Neotropica (monografia)**. New York: Hafner Press, 1973.

SALIMATH, S. S.; OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.O.A.C.; BENNETZEN, J.L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *eleusine* with DNA markers. **Genome**, Canada, v.38, p.757-763, 1995.

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

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p. 151-157, 2004.

SECOND, G. *Manihot glasiivii* contributed to the genetic make-up of cassava and represents an example of dynamic conservation and on-farm breeding of genetic resources. In: CARVALHO, L.J.C.B.; THRO, A.M.; VILARINHOS, A.D. Cassava biotechnology. **IV International Scientific Meeting – CBN. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/ CBN**. p. 135-143. 2000.

SILVA, S. C. ; MARTINS, M. I. G. ; SANTOS, R. C. ; PEÑALOZA, A. P. S. , MELO FILHO, P. A. ; BENKO-ISEPPON, A. M. ; VALLS, J. F. M. e CARVALHO, R. Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the *Heterantheae* section. **Plant systematics and evolution**, V. 285, 3-4,p. 201-207, 2010.

SOARES, J.G.G.; SALVIANO, L.M.C. Cultivo da maniçoba para produção de forragem no semiárido brasileiro. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA (**Instrução Técnica, nº. 33**), 2000.

SOARES, J.G.G. Cultivo da maniçoba para produção de forragem no semi-árido brasileiro. **Comunicado Técnico**, Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, (EMBRAPACPATSA). 4p. 59. 1995.

STACE, C.A.. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. **Taxon**, v.49, p. 53-79. 2000.

STAUB, J.E., SERQUEN, F.C., GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v.31, p.729-740, 1996.

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

VALLE, L. T. Utilização de espécies selvagens no melhoramento de mandioca: passado, presente e futuro. In: HERSHEY, C. H., ed. **Mejoramiento genético dela yuca en América Latina**. Cali: Colombia, CIAT: p. 163-176. 1991.

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

VEIGA, K. P. S. ; ALVES, A. A. C ; ISEPPON, A. M. B.; CARVALHO, R. Estudo do comportamento meiótico em acessos do gênero Manihot. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, CERAT/UNESP, v.5, 2009.

WILKINSON, M.J. The Application and Constraints of New Technologies in Plant Breeding. **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**, Ingenic, Malaysia, p. 27-39, 2000.

ZÁRATER, S.; PÉREZ-NASSER, N.; CASAS, A. Genetics of wild and managed populations of *Leucaena esculenta* subsp. *Esculenta* (Fabaceae; Mimosoideae) in La Montaña of Guerrero, Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v.52, p. 941-957, 2005.

CAPÍTULO II

Análise citogenética convencional de acessos do gênero *Manihot*:

Mitose e meiose

Análise citogenética convencional de acessos do gênero *Manihot*: Mitose e meiose

Kaliny VEIGA Pessoa da Silva¹; Alfredo Augusto da Cunha ALVES² e Reginaldo de CARVALHO¹

¹Laboratório de Genética-Bioquímica e Sequenciamento de DNA, Depto. de Biologia/Genética, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

²Embrapa Mandioca e Fruticultura tropical - EMBRAPA, Cruz das Almas, BA, Brasil.

RESUMO- Análise cariotípica em células mitóticas ou meióticas em relação a homologia cromossômica, variações numéricas, estruturais e poliploidia, além da identificação dos mecanismos envolvidos na evolução dos cariótipos nas espécies podem fornecer informações úteis aos programas de melhoramento que visam a obtenção de cultivares melhoradas. Além disso, um estudo cariotípico em muitos casos contribui para o aumento no número de marcadores citológicos que quando relacionados a determinados aspectos hortícolas auxiliam na caracterização de linhagens e cultivares. As espécies de *Manihot* são consideradas poliplóides apresentando $2n=36$ cromossomos e número básico igual a $x=9$. Contudo, acredita-se que essas espécies tenham sido diploidizadas ao longo do processo evolutivo apresentando hoje, o comportamento meiótico típico de um diplóide. O presente trabalho realizou a análise mitótica e meiótica, em nove espécies do gênero *Manihot* a fim de confirmar a estabilidade cariotípica descrita na literatura. Foram analisadas três variedades da mandioca cultivada e nove espécies silvestres. A análise mitótica revelou uma forte estabilidade cariotípica entre as espécies em relação ao número e morfologia cromossômica. O tamanho médio cromossômico observado foi de 1,75 μ m e número máximo de dois pares de satélites. A meiose nas espécies silvestres foi regular, já nas variedades de *M. esculenta* a meiose foi irregular em ‘manipeba’, com formação de univalentes, bivalentes e trivalentes na metáfase-anáfase I, apresentando comportamento típico de um triplóide. Já em ‘pornunça’ foi parcialmente irregular com formação de políades ao final da microesporogênese. Os resultados obtidos corroboram com a afirmação da condição tetraplóides com base nos parâmetros citogenéticos estudados e a indicação de uma evolução pós poliploidia para o gênero *Manihot*.

Palavras-chave: Poliploidia, Melhoramento, Meiose irregular.

INTRODUÇÃO

O gênero *Manihot* (Euphorbiaceae), é originário do continente americano e está distribuído desde os Estados Unidos até a Argentina possuindo aproximadamente 98 espécies (NASSAR, 2000; ROGERS; APPAN, 1973). O Brasil, por ser um dos principais centros de diversificação, possui uma grande diversidade de espécies do gênero (NASSAR, 2000). De todas as espécies, *Manihot esculenta* Crantz, a mandioca, tornou-se particularmente importante, por ser uma das culturas alimentares mais difundidas no mundo. Da mandioca cultivada se aproveita tanto a parte aérea como as raízes tuberosas, seja para o consumo humano ou animal, sendo utilizada como parte da composição de diversos outros produtos e subprodutos, como: féculas, papel, embalagens, madeira prensada, cola e álcool (TONUKARI, 2004).

As barreiras de isolamento reprodutivo, tais como incompatibilidade gametofítica, isolamento geográfico e diferenças sazonais, em espécies de *Manihot* são fracas, permitindo a ocorrência de hibridação interespecífica natural e artificial entre *M. esculenta* e espécies silvestres (NASSAR, 2001). Os cruzamentos interespecíficos podem ocorrer freqüentemente, produzindo híbridos naturais férteis ou inférteis. Nos casos de esterilidade, essa característica, além de outras alterações cromossômicas, pode não ser facilmente detectada por análise fenotípica comprometendo etapas importantes no melhoramento genético (CARVALHO et al., 1999; CARVALHO et al., 2009). Citogeneticamente, as espécies de *Manihot* são consideradas alotetraplóides com $2n=36$ e um número básico $x=9$. Contudo, acredita-se que essas espécies tenham sido diploidizadas ao longo do processo evolutivo apresentando hoje, o comportamento típico de um diplóide (CARVALHO e GUERRA, 2002).

A análise cariotípica em células meióticas constitui-se uma ferramenta bastante informativa possibilitando a identificação de genótipos férteis, problemas em relação ao pareamento ou reconhecimento dos cromossomos homólogos na progênie híbrida, além de casos de não segregação das cromátides na anáfase, que pode levar à formação de gametas aneuplóides. Essa análise contribui para minimizar possíveis erros de seleção de progênies. Desta forma, a indicação de parentais favoráveis nas hibridações pode ser facilitada através do uso de parâmetros citogenéticos como a análise meiótica. Embora um genótipo possa produzir um grande número de flores aparentemente normais, seus pólenes podem não ser viáveis devido a irregularidades cromossômicas nas células mães de pólenes. Esse tipo de análise pode ser eficiente e de baixo custo (CARVALHO e GUERRA, 2002; VEIGA et al., 2009). O

presente trabalho realizou a caracterização cariotípica mitótica e meiótica em nove espécies e três variedades do gênero *Manihot* por meio da coloração convencional a fim de gerar informações básicas e que podem ser aplicadas em programas de melhoramento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram utilizadas manivas ou manivas e botões florais de três variedades de *Manihot esculenta* ‘manipeba’, ‘Pornunça’ e ‘Aipim Bravo’ além das espécies *M. anômala*, *M. carthaginensis*, *M. dichotoma*, *M. flabellifolia*, *M. glaziovii*, *M. irwinii*, *M. leptophylla*, *M. peruviana* e *M. tomentosa*, provenientes do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA.

Pré-tratamento e fixação

As raízes jovens foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (2mM) por 24 horas a 10 °C, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por um período de 24 horas, e acondicionadas no freezer a –20 °C até posterior análise. Para o estudo meiótico os botões florais foram fixados diretamente em Carnoy e posteriormente analisados.

Análise convencional

Para coloração convencional, as lâminas foram preparadas através do esmagamento em ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula e coradas com Giemsa 2% (GUERRA E SOUZA, 2002). Tanto os botões florais quanto as raízes foram lavados em água destilada, duas vezes de 5 min. cada, hidrolisados em HCl 5N, por 10 a 20 min. Em seguida, as lâminas foram preparadas de acordo com a metodologia de Guerra (1983), montadas com Entellan e analisadas com uso do fotomicroscópio Leica DM 2500, equipado com câmera de vídeo DC 345FX da Leica para captura das imagens as quais foram processadas no programa CW 4000. O comportamento meiótico dos cromossomos foi avaliado a partir de cinco indivíduos de cada espécie e cinco lâminas por indivíduo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise mitótica realizada em *M. esculenta* variedades ‘manipeba’, ‘aipim bravo’ e ‘pornunça’ e nas espécies *M. anômala*, *M. dichotoma*, *M. flabellifolia*, *M. glaziovii*, *M. irwinii*, *M. leptophylla*, *M. peruviana* e *M. tomentosa* revelou uma forte homogeneidade entre os cariótipos dessas espécies, situação contrária a ampla plasticidade botânica observada entre as mesmas. Os cariótipos de todas as espécies analisadas apresentaram-se semelhantes com $2n=36$, com exceção da manipeba que apresentou $2n=54$, morfologia cromossômica de meta a submetacêntrica, tamanho médio cromossômico de 1,75 μ m e número máximo de dois pares satelitados com constrições secundárias (RON) subterminais (Figura 1) como observado também por outros autores (CARVALHO e GUERRA, 2002; NASSAR et al., 1995; UMANAH e HARTMANN, 1973). Apenas a espécie *M. leptophylla* apresentou diferença em seu cariótipo apresentando as constrições secundárias próximas ao centrômero e não subterminal como nas outras espécies (Figura 2. A), sempre sendo observado um número máximo de quatro RONS. Essa mudança na localização das RONS foi considerado como um marcador espécie-específico, que pode, em muitos casos, auxiliar na identificação e na caracterização de linhagens e cultivares a serem usadas no melhoramento genético.

As espécies de *Manihot* são consideradas alotetraplóides e muitas espécies poliplóides possuem o comportamento típico de um diplóide, comportamento esse que teria sido obtido ao longo da evolução com a diploidização do cariótipo como um processo adaptativo (SINGH, 1993). Esse mecanismo pode ter ocorrido dentro do gênero *Manihot* levando a estabilidade cariotípica observada entre suas espécies. As hibridações interespecíficas, com produção de híbridos férteis podem ocorrer, naturalmente ou artificialmente, com quebra de barreiras de isolamento reprodutivo. Por outro lado, todas as espécies, principalmente a mandioca apresentam a via assexuada (estacas ou manivas) como processo alternativo de reprodução, contornando possíveis problemas meióticos pré ou pós-zigóticos (NASSAR, 2000; CARVALHO e GUERRA, 2002).

Para as espécies *M. anômala*, *M. carthaginensis*, *M. flabellifolia* e *M. irwini*, a meiose apresentou-se regular, evidenciando cariótipo com $2n=36$ e $n=18$ (Figura 2. B-C). Este número cromossômico está de acordo com estudos anteriores para as espécies do gênero (GRANER, 1935; CARVALHO e GUERRA 2002; NASSAR, 2006). O pareamento entre os bivalentes foi normal durante a metáfase I com formação de 18 bivalentes, resultando em uma segregação cromossômica aparentemente regular durante a anáfase I e II e sem formação de

ponte anafásica (Figura 2. B-C). No final da microsporogênese, formaram-se quatro micrósporos, revelando uma meiose regular. Por outro lado, a variedade ‘Pornunça’, apresentou meiose irregular com surgimento de meiócitos com quatro a seis micrósporos no interior (Figura 2. F). Já a variedade ‘Manipeba’ apresentou irregularidade total, $2n=54$, com formação de univalentes, bivalentes e trivalentes na metáfase-anáfase I (Figura 2. G), comportamento este, típico de um triplóide cujo número cromossômico diplóide $2n=54$ foi descrito pela primeira vez por Carvalho et al. (1999). A segregação cromossômica foi irregular no final da meiose (anáfase II), resultando em 100% das tétrades ou “políades” anormais apresentando um grande número de células no interior, em média 20 células por meiócito (Figura 2. H). O gênero *Manihot* foi considerado tetraplóide com base na ocorrência de quatro constrições secundárias e dois pares de homólogos (UMANAH e HARTMANN, 1973). No entanto, a condição poliplóide poderia significar irregularidade meiótica, com queda no percentual de fertilidade.

A regularidade meiótica apresentada nas espécies *M. irwini*, *M. anômala*, *M. carthaginensis* e *M. flabellifolia* sugere que as espécies do gênero possuem estabilidade cariotípica inclusive quanto ao tamanho, morfologia e número diplóide, $2n=36$. A “diploidização” cariotípica, segundo Singh (1993), é um processo adaptativo dos cariótipos durante a evolução e pode ser o melhor processo para explicar o sucesso de algumas populações poliplóides na natureza. Segundo Carvalho e Guerra (2002), isso pode ter ocorrido nas espécies do gênero *Manihot*, onde hibridações interespecíficas com produção de híbridos férteis podem ter ocorrido naturalmente com quebras de barreiras reprodutivas.

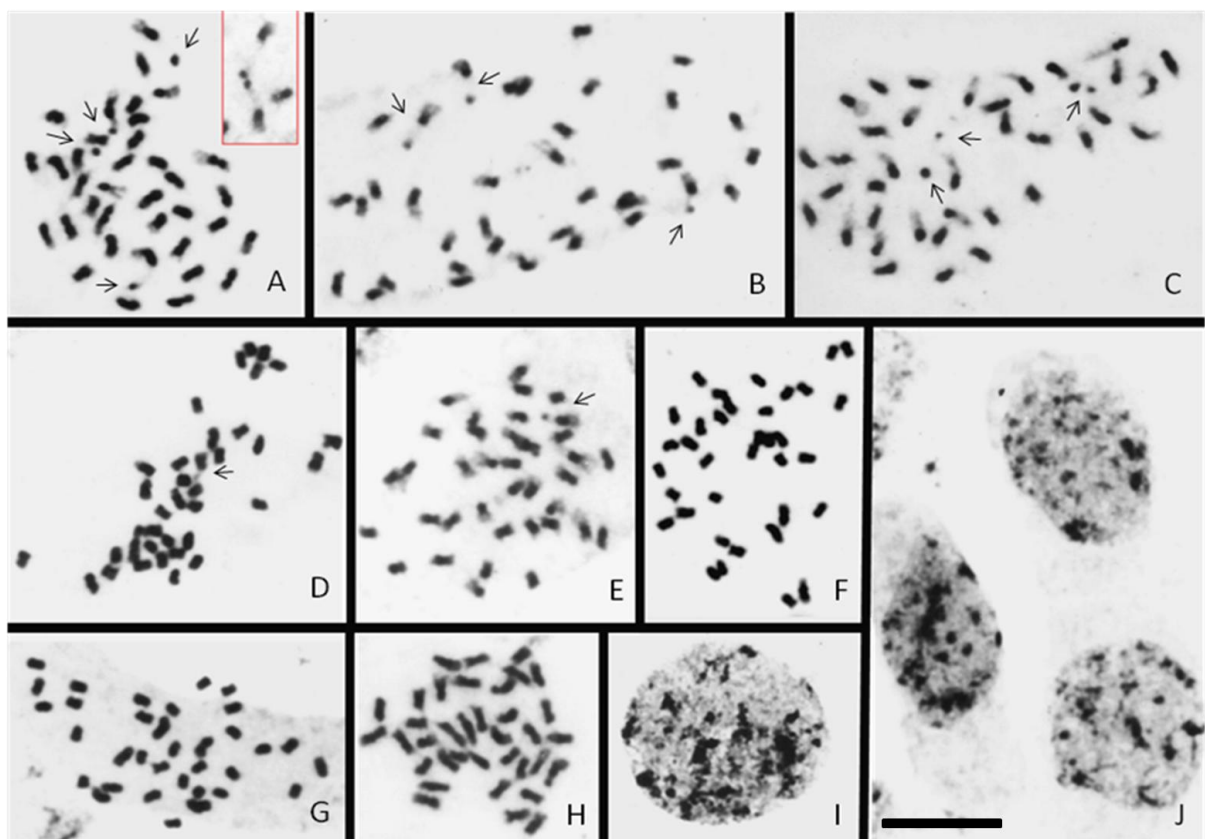


Figura 1. Prometáfases, Metáfases e núcleos interfásicos de espécies de *Manihot*. **A-C)** *Manihot esculenta* ‘manipeba’, ‘Pornunça’ e ‘Aipim Bravo’, $2n= 54$; **D)** *M. glaziovii*, $2n=36$; **E)** *M. tomentosa*, $2n= 36$; **F)** *M. irwinii*, $2n=36$; **G)** *M. anômala*, $2n=36$; **H)** *M. dichotoma*, $2n=36$; **I)** *M. flabellifolia*, $2n=36$; **J)** *M. peruviana*, $2n=36$. Setas apontam satélites. Observe na foto ‘a’ uma seção mostrando dois cromossomos satelitados associados no momento da expressão das RONS. Barra corresponde a 10 μ m.

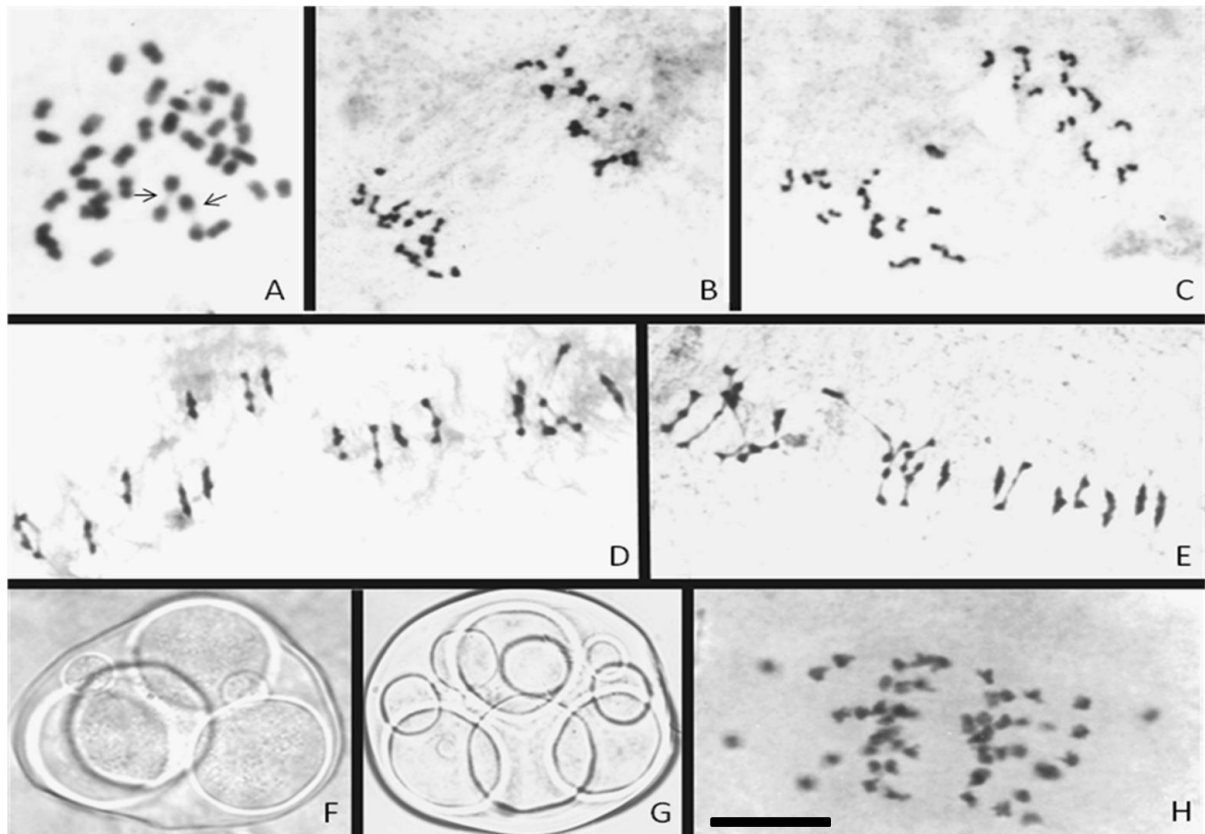


Figura 2. A) Metáfase mitótica de *M. leptophylla*, $2n=36$. Observe o par satelitado com constrição secundária proximal (seta); B-C) anáfase I de *M. irwini* e *M. anomala*, $2n=36$; D-E) metáfase I com 18 bivalentes de *M. carthagenensis* e *M. flabelifolia*, $2n=36$; F) *M. esculenta* var. 'Pornunça', $2n=36$, Tétrade com duas pequenas células adicionais; G-H) *M. esculenta* var. 'Manipeba', $2n=54$, Políade em Meiose II e anáfase I apresentando irregularidade com a maioria dos cromossomos retardatários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v.136, p. 159-168. 2002.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M.; CARVALHO, P.C.L. Occurrence of spontaneous triploidy in *Maniho esculenta* Crantz. **Cytologia**, v.64, p.137-140, 1999.
- CARVALHO, R. ; VEIGA, K.P.S.; OLIVEIRA, I. F.; ALVES, A. A. C. Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot*. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, CERAT/UNESP, v.5, 2009.
- GRANER, E.A. Contribuição para o estudo citológico da mandioca. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, USP, Piracicaba, p.28, 1935.
- GUERRA, M. Uso do giemsa na citogenética vegetal: comparação entre bandeamento simples e o bandeamento. **Ciência e Cultura**, v.35, p. 190-193. 1983.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar cromossomos. **Funpec**, 131p. Ribeirão Preto. 2002.
- NASSAR, N.M.A.; NASSAR H.N.M.; VIEIRA, C.; SARAIVA, S.L. Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and its backcross progeny. **Canadian Journal of Plant Science**. v.75, p. 675–678. 1995.
- NASSAR, N.M.A. Wild cassava spp.: biology and potentialities for genetic improvement. **Genetic Molecular Biology**, v. 23, p. 201-212, 2000.
- NASSAR, N. M. A. The nature of apomixis in cassava (*Manihot esculentum*, Crantz). **Hereditas**. 134: 185-187. 2001.
- NASSAR, N.M.A. Chromosome doubling apomixis in *cassava* x *Manihot anomola* hibrid. **Hereditas**, v.143, p.246-248, 2006.
- ROGERS, D.J.; APPAN, S.G. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae). **Flora Neotropica (monografia)**. New York: Hafner Press, 1973.

TONUKARI, N. J. Cassava and the future of starch. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 5-8, 2004.

SINGH, R. J. plant cytogenetics. **CRC Press**, Inc. Boca Raton: p. 111-254.1993.

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

VEIGA, K. P. S. ; ALVES, A. A. C ; ISEPPON, A. M. B.; CARVALHO, R. Estudo do comportamento meiótico em acessos do gênero *Manihot*. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, CERAT/UNESP, v.5, 2009.

CAPÍTULO III

Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* através do uso de marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* através do uso de marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Kaliny VEIGA Pessoa da Silva¹; Alfredo Augusto da Cunha ALVES²; Maria Isabel Gomes MARTINS¹; Cláudio Antônio Ferreira de MELO³ e Reginaldo de CARVALHO¹

¹Laboratório de Genética-Bioquímica e Sequenciamento de DNA, Depto. de Biologia/Genética, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

²Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical - EMBRAPA, Cruz das Almas, BA, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus, BA

RESUMO - O gênero *Manihot* possui uma ampla variabilidade genética em virtude de suas espécies intercruzarem e produzirem híbridos férteis que podem ser úteis ao melhoramento genético servindo como doadores de genes desejáveis a *M. esculenta*, espécie cultivada do gênero. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética intra e interespecífica dos acessos de *Manihot* através do uso de marcadores ISSR (Simple sequência repetida interna). O marcador molecular ISSR tem se mostrado informativo no estudo da diversidade genética e das relações filogenéticas evolutivas, bem como na caracterização de diversos acessos e cultivares. Neste trabalho foram analisadas cinco espécies e duas variedades do gênero *Manihot*, além de duas espécies do gênero *Croton* utilizadas como grupo externo, através do uso de um conjunto de 20 oligonucleotídeos iniciadores (Oli) ISSR UBC. Para análise do índice de similaridade entre as espécies e acessos, foram utilizados os coeficientes de Jaccard e Simple matching. Os 20 Oligonucleotídeos testados foram altamente polimórficos para todas as espécies analisadas, sendo 89,7% dos locos polimórficos, no entanto, como esperado, foi observado uma alta similaridade entre as variedades da espécie cultivada. Os dados obtidos demonstraram a eficiência do marcador para estudos intra e interespecíficos no gênero *Manihot*.

Palavras-chave: Polimorfismo, Germoplasma, Diversidade genética, Mandioca.

INTRODUÇÃO

O gênero *Manihot* possui 98 espécies, sendo que o Brasil central (Sul de Goiás e Oeste de Minas Gerais) é considerado o maior centro de diversificação, seguido do Sudeste do México, Nordeste do Brasil, Sudeste do Mato Grosso e Bolívia (NASSAR, 1978; 2000). A mandioca é a espécie cultivada do gênero de grande importância e uma das maiores fontes de amido, sendo consumida por mais de 600 milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (EL-SHARKAWY, 2006). O gênero *Manihot* apresenta variabilidade genética natural em virtude de suas espécies intercruzarem e produzirem híbridos com fertilidade. Essa característica favorece projetos de pesquisa visando o melhoramento genético com a mandioca cultivada (NASSAR e GRATAPAGLIA, 1986).

Os marcadores moleculares são ferramentas eficazes no estudo dos genomas, uma vez que detectam polimorfismos diretamente ao nível do DNA, não sofrendo influência ambiental e sendo independentes do estágio de desenvolvimento do vegetal (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). Em geral, são baseados na amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e têm sido grandemente empregados nos programas de melhoramento de plantas. Os marcadores moleculares podem ser utilizados, por exemplo, no estudo da diversidade genética de populações, avaliação do potencial dos recursos genéticos disponíveis, construção de mapas de ligação, detecção de QTLs e suas associações com características agrônomicas, dentre outras aplicações (BENKO-ISEPPON et al., 2003).

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) é uma técnica alternativa para estudar polimorfismos baseados em microssatélites através dos genomas. O marcador molecular ISSR tem se mostrado uma poderosa ferramenta para análise da diversidade genética, bem como na caracterização de acessos e cultivares de diversas espécies como o cacau e também espécies do gênero *Solanum* (CHARTERS e WILKINSON, 2000; ISSHIKI et al., 2008). É um marcador multiloco que não necessita de um conhecimento prévio do DNA ser estudado (GUPTA et al., 1994), apresenta-se como uma técnica de baixo custo, de fácil uso e grande reprodutibilidade (MATTEHEWS, 1999). ISSR utiliza uma sequência simples repetida como oligonucleotídeo iniciador (Olii) para amplificar um fragmento de DNA delimitados por dois microssatélites invertidos gerando um alto nível de polimorfismo. Bornet e Branchard (2004) utilizaram nove Olii ISSRs e demonstraram haver diferentes níveis de polimorfismo entre *Brassica* e *Arabidopsis* e uma maior abundância de sequências de microssatélites no genoma

de *Brassica*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética intra e interespecífica de acessos de *Manihot* através do uso de marcador ISSR, visando gerar informação básica para fins de aplicação em programas de melhoramento genético.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Foram estudadas cinco espécies e duas variedades do gênero *Manihot*, *M. esculenta* var. ‘cruvela’, *M. esculenta* var. ‘mandiocaba’, *M. caerulescens*, *M. dichotoma*, *M. dichotoma* var. *ondulata* e *M. flabelifolia* todas provenientes da coleção de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical – CNPMF, Cruz das Almas, BA. Além dessas, uma espécie identificada como *M. noronhensis* do Arquipélago de Fernando de Noronha, PE também foi estudado. Utilizou-se ainda, como material controle, duas do gênero *Croton*: *C. fruticosus* e *C. rhamnifolius*.

Extração e Quantificação de DNA Genômico

Folhas jovens, situadas no terço superior da planta, foram coletadas para extração de DNA, seguindo-se a metodologia de Doyle e Doyle (1990). As amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8% e visualizadas sobre luz ultravioleta. Todas as amostras foram aliqüotadas a 5 ng/μl para utilização em reações de PCR.

Amplificação por PCR e análise dos polimorfismos gerados

Um conjunto de 20 oligonucleotídeos iniciadores (Olii) ISSR UBC [University of British Columbia] (Tabela 1) foi testado para amplificação via PCR. O marcador ISSR seguiu o protocolo de BORNET E BRANCHARD (2001) otimizado para o presente estudo. As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 20 μL contendo: 0,7 U de enzima ‘*Taq* DNA polimerase’, tampão da enzima 1x, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 50 μM de *primer* e 25 ng de DNA genômico. O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento do olii a 49,7-58°C (dependendo do olii) por 35 seg e extensão a 72°C por 2 min, seguida de extensão

final por 7 min a 72°C. A amplificação foi corada com Sybr e separada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão de TAE 10X e foram visualizados e fotografados sob luz ultra-violeta.

Análise estatística dos produtos amplificados por ISSR

A partir dos produtos amplificados, foi construída uma matriz binária baseada em informações de presença e ausência de bandas características de cada iniciador para cada um dos acessos. Para análise de similaridade foi empregado o coeficiente de Jaccard e Simple matching, através do programa NTSYS–pc 2.1 software (ROHLF, 2000) e o dendograma foi construído com base no agrupamento estatístico UPGMA. O índice PCO também foi utilizado para análise comparativa usando o *software* FAND 1.23 (SCHLÜTER e HARRIS, 2006) agrupando as espécies também com base no coeficiente de Jaccard.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 20 Oligonucleotídeos testados foram altamente polimórficos e amplificaram um total de 584 bandas (Tabela 1). O número de bandas variou de 13 no olii UBC 841 a 48 no olii UBC 810, possuindo entre 200 até 2000pb. A figura 1 mostra o perfil eletroforético apresentado por alguns dos olii ISSR utilizados neste trabalho. Com relação ao número de lócus o total foi de 155 variando de 3 lócus nos olii UBC 816 e 841 a 16 no UBC 810, deste total 99,3% dos lócus foram polimórficos. O menor valor polimórfico ocorreu no Olii UBC 887. No entanto, observou-se que em 15 dos 155 lócus, o polimorfismo ocorreu exclusivamente devido a presença do grupo externo, havendo então homogeneidade nesses lócus para as espécies de *Manihot* (Tabela. 1). Assim sendo, considerou-se que 89,7% representa de fato, o polimorfismo existente entre os acessos estudados do gênero *Manihot*. Usando marcadores ISSR no estudo da variabilidade genética em etnovarietades de mandioca Mühlen et al. (2000), obteve 97,96% de olii polimórficos e uma média geral de 4,5 alelos por loco. Segundo Freitas et al. (2000) o resultado de estudos com marcadores obtidos para as espécies cultivadas, como o trigo (similaridade média equivale a 73%), mostrou um índice menor de polimorfismo, revelando, segundo os autores, uma estreita relação entre domesticação e similaridade genética entre variedades.

A similaridade genética apresentada pelo coeficiente de Jaccard, para as espécies do gênero *Manihot*, revelou a maior proximidade entre as espécies *M. dichotoma* var. *ondulata* e *M. caerulescens* (0.5098) e a menor entre *M. esculenta* var. 'Mandiocaba' e *M. dichotoma* (0.3137) (Tabela 2). A mesma análise de similaridade realizada pelo coeficiente Simple matching mostrou uma maior similaridade entre as espécies *M. esculenta* var. *mandiocaba* e *M. esculenta* var. *cruvela* (0.6967) enquanto que menor relação de proximidade genética foi encontrada entre *M. noronhensis* e *M. dichotoma* (0.5290) (Tabela 3). Nos dendogramas gerados pelos dois coeficientes podemos observar a formação de 3 grupos distintos formados por: 1- as duas espécies do grupo externo; 2- *M. caerulescens*, *M. dichotoma* e *M. dichotoma* var. *ondulata* 3- *M. esculenta* var. *mandiocaba*, *M. esculenta* var. *cruvela* e *M. flabelifolia* (Figura 2 e 3). No entanto observa-se que a *M. noronhensis* ficou excluída dos grupos formados, revelando uma distância genética maior entre a mesma e as outras espécies analisadas neste trabalho, fato que pode ser atribuído a distância geográfica existente entre esta espécie e as demais do gênero, já que a *M. Noronhensis* foi introduzida na ilha de Fernando de Noronha – PE onde pode ter adquirido diferenças adaptativas. Através do uso de marcadores microssatélites a maior distância genética observada por Vieira et al., (2009) entre 32 variedades de mandioca foi de 0,9100, esse resultado se deve possivelmente ao maior número de variedades analisadas e ao fato de todas pertencerem a uma mesma espécie.

Observando os dois coeficientes fica bem clara a distância genética existente entre as variedades da espécie cultivada *M. esculenta* e os dois acessos de *M. dichotoma*. As duas variedades de *M. esculenta*, 'Cruvela' e 'Mandiocaba', aparecem muito próximas, em concordância com o fato de representarem a mesma espécie e apresentando-se agrupadas com a espécie *M. flabelifolia*, fato que reforça a opinião de vários autores que apontam esta espécie como provável ancestral da mandioca cultivada baseados no uso de marcadores moleculares (OLSEN e SCHAAL, 2001; OLSEN, 2004). Outro fato que chamou a atenção foi a similaridade existente entre a *M. dichotoma* var. *ondulata* e a *M. caerulescens*, que foi maior do que a similaridade entre *M. dichotoma* e a *M. dichotoma* var. *ondulata*, identificadas como pertencentes a mesma espécie, mas que apresentam diferenças botânicas marcantes quanto ao formato e tamanho dos frutos, folhas, quantidade de látex e porte da planta. Enquanto que a *M. dichotoma* var. *ondulata* e a *M. caerulescens* apresentam uma maior semelhança morfológica.

Com base no coeficiente de Jaccard foi gerado também o gráfico PCO (Gráfico de distribuição em coordenadas principais) (Figura 4). Neste gráfico assim como nos dois dendogramas gerados os acessos de *M. esculenta*, ‘Cruvela’ e a ‘Mandiocaba’, aparecem muito próximas, havendo proximidade também entre a *M. dichotoma* var. *ondulata* e a *M. caerulescens* (Figura 4). Observou-se neste gráfico que as duas espécies do grupo externo são distantes entre si, *C. fruticosus* acima do eixo Z e *C. rhamnifolius* abaixo do axis Z com apenas 0.1639 de similaridade genética. As espécies *M. caerulescens*, *M. dichotoma*, *M. dichotoma* var. *ondulata* e *M. flabelifolia* estão dispostas no mesmo bloco. As variedades ‘mandiocaba’ ‘cruvela’ também estão agrupadas no mesmo bloco, sustentadas por um coeficiente de similaridade de Jaccard de 0.5 (Figura 4).

Marcadores ISSR têm sido amplamente empregados para detectar polimorfismos intraespecíficos em diversas espécies cultivadas incluindo as do gênero *Citros* e também outras culturas como amendoim e arroz (PHARMAWATI et al., 2004). Blair et al. (1999) obtiveram, em arroz, maior porcentagem de fragmentos polimórficos com marcadores ISSR quando comparados a marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Embora ISSR sejam marcadores dominantes, têm a vantagem de analisar *loci* múltiplos em uma única reação (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001), além de produzirem fragmentos com grande reprodutibilidade, quando comparados a outros marcadores com base em PCR não-específico como RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (WOLFE e LISTON, 1998). Para o gênero *Manihot* a alta reprodutibilidade dos marcadores ISSR revelou claras divergências genéticas entre as espécies estudadas neste trabalho, observando-se polimorfismo genético entre variedades cultivadas e as demais espécies.

A utilização de dois coeficientes estatísticos, Jaccard e Simple matching, para avaliar o nível de similaridade genética, permitiu uma comparação entre os resultados e aumentou a confiabilidade dos mesmos, mostrando que tanto os dendogramas, quanto o gráfico PCO, seguiram a mesma linha no padrão de polimorfismo e que embora a maioria dos trabalhos não utilize o Simple matching para análise de dados binários este coeficiente, para *Manihot*, mostrou-se satisfatório.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores ISSR, incluindo suas temperaturas de anelamento (T_m), número total de bandas, número total de loci, número de loci polimórficos e porcentagem de polimorfismo. Letras significando oligonucleotídeos degenerados: D = (A,G,T); Y= (C, T) e V= (A, C, G).

Olii	Sequência (5' → 3')	T _m (C°)	N° total de bandas	N° total de loci	Lócus polimórficos	% Polimorfismo
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52.8	44	10	10	100%
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50.4	48	16	16	100%*
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52.8	18	5	5	100%
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	50.4	20	5	5	100%*
815	CTCTCTCTCTCTCTG	52.8	20	4	4	100%*
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	50.4	17	3	3	100%*
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	50.4	18	5	5	100%*
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	53.0	27	10	10	100%*
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	51.0	42	9	9	100%*
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	50.4	38	10	10	100%*
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	52.8	24	5	5	100%*
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	52.8	36	7	7	100%
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	50.0	20	7	7	100%
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	52.0	13	3	3	100%
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	54.0	34	9	9	100%
861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	60.5	17	5	5	100%*
862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	58.0	35	7	7	100%*
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	51.9	27	10	10	100%
887	DVD TCT CTC TCT CTC CT	52.0	43	9	8	88,9%
888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	52.0	43	10	10	100%
Total:			584	155	154	99,3%

(*) polimorfismo ocorrido apenas em razão do grupo externo

Tabela 2. Coeficiente de similaridade genética entre espécies do gênero *Manihot* e grupo externo *Croton* pelo método de Jaccard. 1- *M. esculenta* var. ‘Mandiocaba’; 2- *M. noronhensis*; 3- *M. esculenta* var. ‘Cruvela’; 4- *M. caerulescens*; 5; *M. dichotoma*; 6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; 7- *M. flabelifolia*; 8-*Croton fruticosus* e 9- *C. rhamnifolius*.

	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8	Sp9
Sp1	1								
Sp2	0.3738	1							
Sp3	0.5000	0.3962	1						
Sp4	0.3551	0.3571	0.3644	1					
Sp5	0.3137	0.3177	0.4062	0.4479	1				
Sp6	0.3669	0.3684	0.3888	0.5098	0.4444	1			
Sp7	0.4368	0.3963	0.4190	0.3783	0.3921	0.4952	1		
Sp8	0.1744	0.1368	0.2142	0.1397	0.1585	0.1578	0.1720	1	
Sp9	0.1702	0.1818	0.2065	0.1500	0.1954	0.2142	0.1800	0.1639	1

Tabela 3. Coeficiente de similaridade genética entre espécies do gênero *Manihot* e grupo externo *Croton* pelo método Simple matching. 1- *M. esculenta* var. Mandiocaba; 2- *M. noronhensis*; 3- *M. esculenta* var. Cruvela; 4- *M. caerulescens*; 5; *M. dichotoma*; 6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; 7 *M. flabelifolia*; 8- *Croton fruticosus* e 9- *C. rhamnifolius*.

	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8	Sp9
Sp1	1								
Sp2	0.5677	1							
Sp3	0.6967	0.5870	1						
Sp4	0.5548	0.5354	0.5612	1					
Sp5	0.5483	0.5290	0.6322	0.6580	1				
Sp6	0.5548	0.5354	0.5741	0.6774	0.6451	1			
Sp7	0.6258	0.5677	0.6064	0.5548	0.6000	0.6580	1		
Sp8	0.5419	0.4709	0.5741	0.4838	0.5548	0.4838	0.5032	1	
Sp9	0.4967	0.4774	0.5290	0.4516	0.5483	0.5032	0.4709	0.6709	1

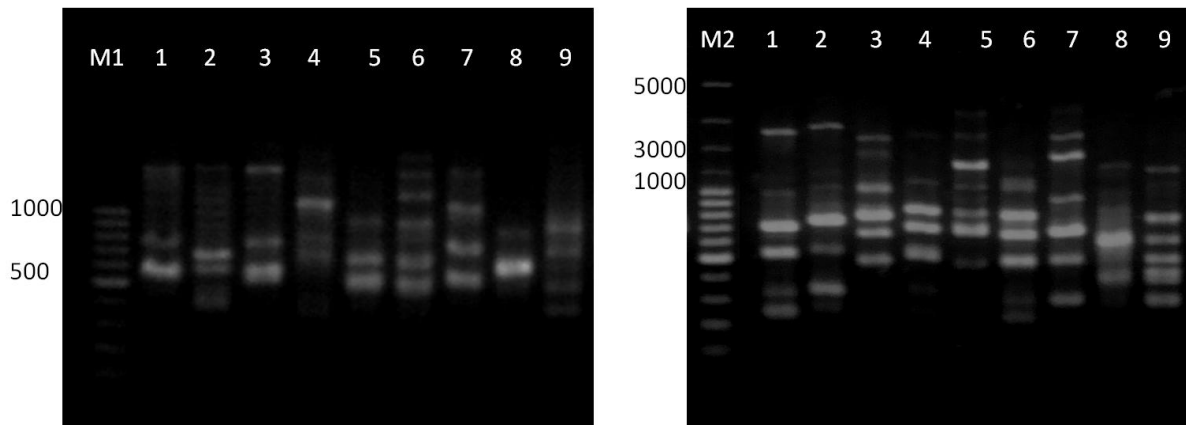


Figura 1. Produtos das ampliações ISSR-PCR em gel de agarose 1,2%. Oligonucleotídeos iniciadores UBC 823 e 810. M1- marcador DNA Ladder Plus 100pb; M2- marcador DNA Ladder Plus 1Kb; 1- *M. esculenta* var. ‘Mandiocaba’; 2- *M. noronhensis*; 3- *M. esculenta* var. ‘Cruvela’; 4- *M. caerulescens*; 5- *M. dichotoma*; 6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; 7 *M. flabelifolia*; 8- *Croton fruticosus* e 9- *C. rhamnifolius*.

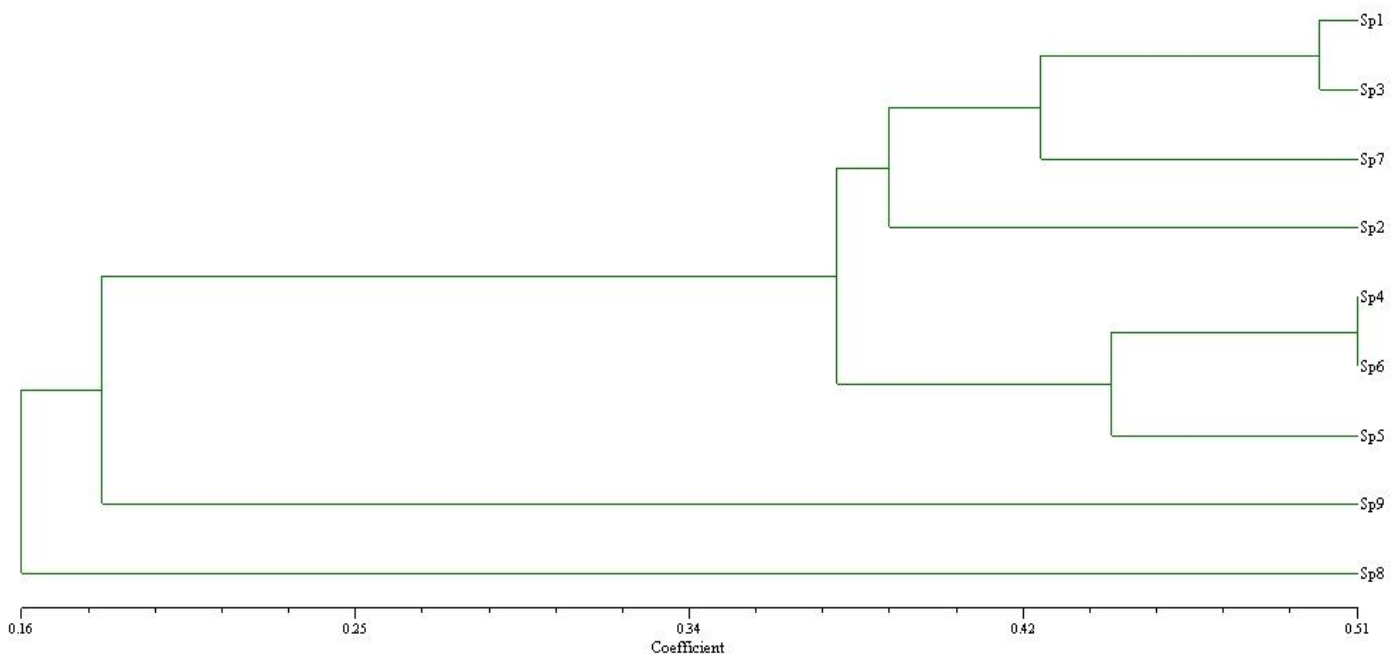


Figura 2. Dendrograma obtido pela análise das variações nas regiões ISSR das espécies pelo coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA. Sp1- *M. esculenta* var. ‘Mandiocaba’; Sp 2- *M. noronhensis*; Sp3- *M. esculenta* var. ‘Cruvela’; Sp4- *M. caerulescens*; Sp5; *M. dichotoma*; Sp6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; Sp7- *M. flabelifolia*; Sp8- *Croton C. fruticosus* e Sp9- *C. Rhamnifolius*.

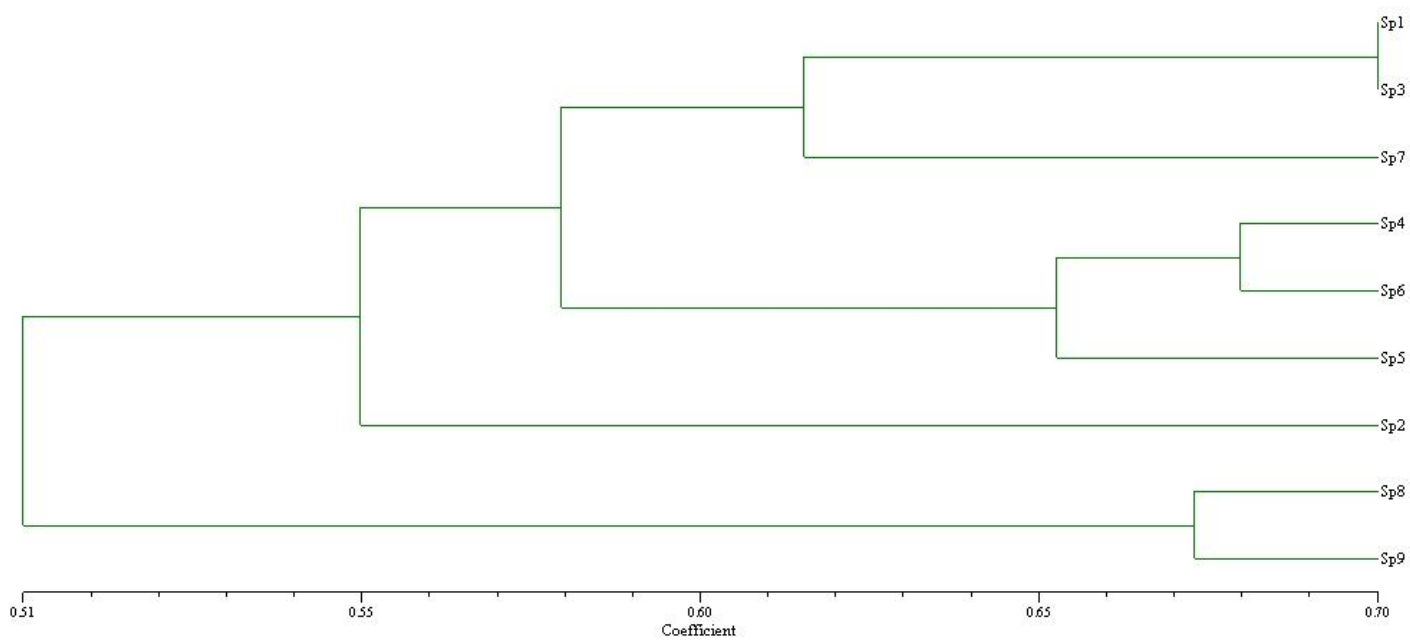


Figura 3. Dendrograma obtido pela análise das variações nas regiões ISSR das espécies pelo coeficiente de Simple matching e método de agrupamento UPGMA. Sp1- *M. esculenta* var. Mandiocaba; Sp 2- *M. noronhensis*; Sp3- *M. esculenta* var. Cruvela; Sp4- *M. caerulescens*; Sp5; *M. dichotoma*; Sp6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; Sp7- *M. flabelifolia*; Sp8- *Croton fruticosus* e Sp9- *C. Rhamnifolius*.

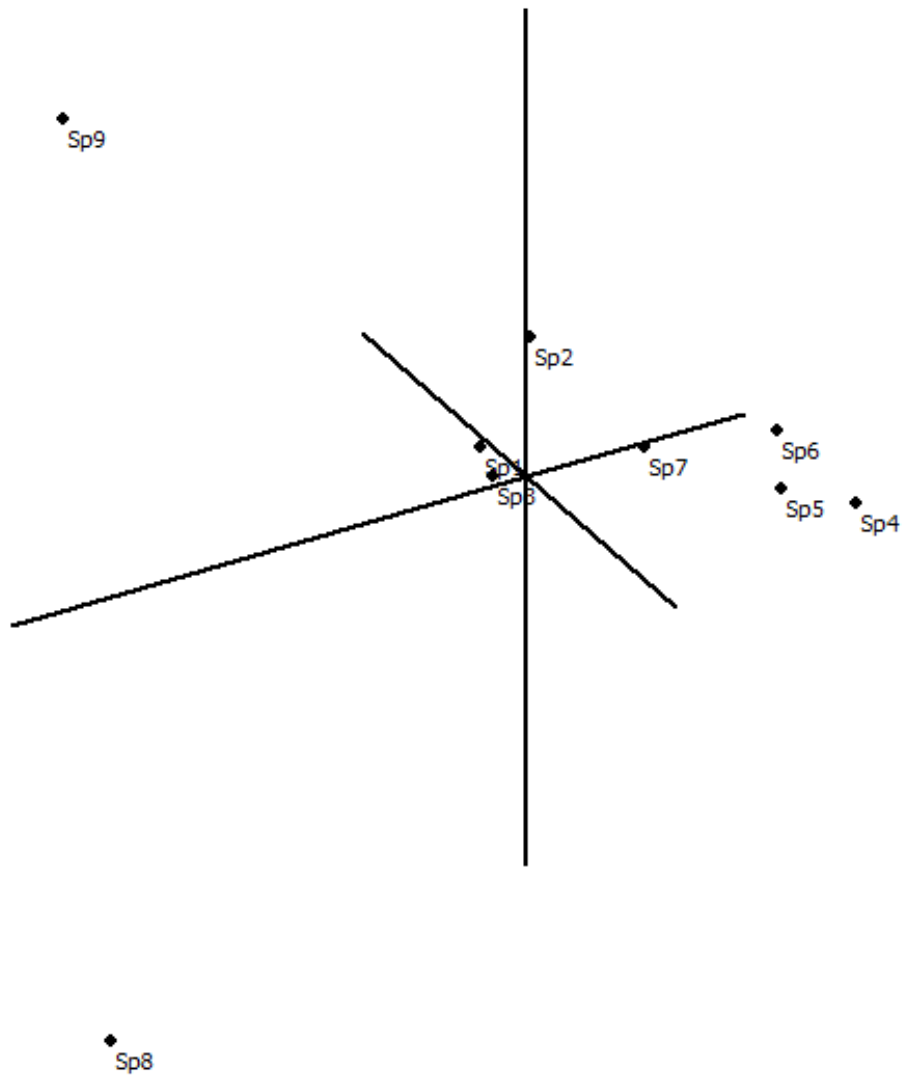


Figura 4 – Análise de PCO baseado no coeficiente de Jaccard em espécies do gênero *Manihot*. Sp1- *M. esculenta* var. Mandiocaba; Sp 2- *M. noronhensis*; Sp3- *M. esculenta* var. Cruvela; Sp4- *M. caerulea*; Sp5; *M. dichotoma*; Sp6- *M. dichotoma* var. *ondulata*; Sp7- *M. flabelifolia*; Sp8- *Croton fruticosus* e Sp9- *C. Rhamnifolius*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MÜHLBAUER, F.; KAHL, G. Markers closely linked to Fusarium resistance genes in chickpea show homology to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosome 5 and 1. **Theoretical and Applied Genetics**, n.103, p.379-286, 2003.

BLAIR, M. W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S. R. Intersimple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 98, n. 5, p. 780-792, 1999.

BORNET, B., BRANCHARD, M. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related Brassica taxa and *Arabidopsis thaliana*. **Hereditas**, V.140: 245-248. 2004.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology**. v. 19: 209–215. 2001.

CHARTERS. Y.M.; WILKINSON, M.J. The use of self-pollinated progenies as “In-groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 160-166. 2000.

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

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA-CENARGEN**, 3. Ed, 220p. 1998.

FREITAS, L.B.; JERUSALINSKY, L.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M. Extreme homogeneity among Brazilian Wheat genotypes determined by RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 2255-2260. 2000.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica** v.122, p. 81-89. 2001.

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**. v.89, p.998-1006. 1994.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M.R. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**. v.117, p.186-190, 2008.

MATTHEWS, D.; WILKINSON, M.W.; MILLAM, S. 5'-anchored simple-sequence repeat primers are useful for analysing potato somatic hybrids. **Plant Cell Reports**, Windsor, v. 19, n. 2, p. 210-212, 1999.

MUHLEN, G. S. MARTINS, P. S. ANDO A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca avaliada por marcadores moleculares de DNA. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 319-328, 2000.

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

NASSAR, N.M.A. Genetic resources of cassava: chromosome behavior in some *Manihot* species. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**. v.38, p.135-137.1978.

NASSAR, N.M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Variabilidade de clones de mandioca em relação a fertilidade e aspectos morfológicos. **Turrialba**, v.36, p. 555-559. 1986.

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, p. 131-142. 2001.

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

PHARMAWATI, M.; YAN, G.; MCFARLANE, I. J. Application of RAPD and ISSR markers to analyse molecular relationships in *Grevillea* (Proteaceae). **Australian Systematic Botany**, Collingwood, n. 17, p. 49-61, 2004.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. **Exeter Software**, New York, 98p. 2000.

SCHLÜTER, M.P; HARRIS, A.S. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Resources**. v.6, n.2, p. 569-572. 2006.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.F.; KUKUDA, W.M.G.; SANTOS FILHO, M.O.S. Comportamento de genótipos de mandioca de mesa no Distrito Federal. **Ciência Agrônômica**, v.40, p113-122, 2009.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing**. Boston: Kluwer, p.43-86. 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

- As espécies de *Manihot* apresentam cariótipo com elevada estabilidade cariotípica quanto ao tamanho, morfologia e número cromossômico $2n=36$, o que contrasta com a ampla plasticidade botânica apresentada pelas espécies do gênero. No entanto essa estabilidade não pode ser vista como regra geral uma vez que a espécie *M. leptophylla* apresentou alteração cromossômica com mudança de posição das regiões organizadoras de nucléolos que passaram da posição subterminal para proximal;
- A regularidade meiótica apresentada pela maioria das espécies estudadas pode ser resultado de um processo de diploidização ocorrido nas espécies do gênero *Manihot*, onde hibridações interespecíficas com produção de híbridos férteis podem ter ocorrido naturalmente com quebras de barreiras reprodutivas;
- O uso de marcadores ISSR foi eficaz gerando resultados satisfatórios para as espécies de *Manihot*, revelando divergências genéticas intra e interespecíficas através do polimorfismo genético identificado;
- A técnica molecular possibilitou identificar maior similaridade genética entre espécies diferentes *M. dichotoma* var. *Ondulata* e *M. caerulescens*, do que entre indivíduos da mesma espécie *M. dichotoma* e *M. dichotoma* var. *Ondulata*. Esse dado indica a eficácia da metodologia utilizada e sua possível utilização em estudos evolutivos.
- A concordância dos dados obtidos com a aplicação dos coeficientes estatísticos aumentou a confiabilidade dos resultados possibilitando uma maior robustez na análise.