



MÁRCIA DE NAZARÉ OLIVEIRA RIBEIRO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ANATOMIA
FOLIAR EM ACESSOS DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz)**

LAVRAS - MG

2010

MÁRCIA DE NAZARÉ OLIVEIRA RIBEIRO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR EM ACESSOS DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Samuel Pereira de Carvalho

Coorientadores

Dr. Evaristo Mauro de Castro

Dr. João Bosco dos Santos

LAVRAS - MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Ribeiro, Márcia de Nazaré Oliveira.

Diversidade genética e anatomia foliar em acessos de mandioca
(*Manihot esculenta* Crantz) / Márcia de Nazaré Oliveira Ribeiro. –
Lavras : UFLA, 2010.

77 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Samuel Pereira de Carvalho.

Bibliografia.

1. Variabilidade genética. 2. Genética molecular. 3. Plasticidade
anatômica. 4. Anatomia quantitativa. 5. Marcadores microssatélites.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.68223

MÁRCIA DE NAZARÉ OLIVEIRA RIBEIRO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR EM ACESSOS DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 08 de outubro de 2010.

Dr. Adriano Bortolotti da Silva	UNIFENAS
Dr. Ângelo Alberico Alvarenga	EPAMIG
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Luiz Antônio de Bastos Andrade	UFLA

Dr. Samuel Pereira de Carvalho
Orientador

Dr. João Bosco dos Santos
Coorientador

LAVRAS - MG

2010

Aos meus pais, Juarez e Maria, pelo amor eterno e apoio incondicional. Aos meus irmãos, a DEUS e á VIRGEM MARIA, por estarem sempre ao meu lado e guiarem minha VIDA.

DEDICO E OFEREÇO

“Direi do Senhor: Ele é o meu DEUS, o meu refúgio, a minha fortaleza e nele confiarei” - Salmo 91

AGRADECIMENTOS

A DEUS PAI TODO PODEROSO, à VIRGEM MARIA e a JESUS CRISTO, por guiarem meus passos, iluminarem meu caminho e abençoarem minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade da realização da pós-graduação e pela contribuição para a minha formação acadêmica.

Aos professores Samuel Pereira de Carvalho, João Bosco dos Santos e Evaristo Mauro de Castro, pela orientação e ensinamentos, importantes para a minha formação profissional.

Aos professores Silvério José Coelho, Élberis Pereira Botrel, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, Luiz Antônio de Bastos Andrade, Lisete Chamma Davide e José Caetano Vieira Neto pela amizade, oportunidades e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora pela análise crítica deste trabalho bem como pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos meus amigos e colegas, em especial ao Antônio (Toninho), pelo companheirismo e ajuda em vários momentos da minha vida em Lavras e ao Fabrício, Rafaela e Fernanda pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos meus amigos Vantuil Rodrigues, Antônio Claret, Antônio Carlos e Lamartine Nóbrega, funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos (DAG) e do Laboratório de Genética Molecular (DBI) da UFLA, pelo convívio e ensinamentos.

À minha família.

Enfim, a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Dentre as principais fontes de carboidratos do mundo para alimentação humana e animal encontra-se a mandioca. Consumida *in natura* ou processada, como alimento ou produtos industrializados. Várias técnicas se aplicam ao cultivo da mandioca, visando ao melhoramento, a exemplo do uso de marcadores moleculares e do estudo anatômico. O presente trabalho é composto por dois experimentos. No primeiro ensaio, o DNA foi amplificado com 14 *primers* microssatélites, dos quais 12 foram polimórficos e amplificaram um total de 26 alelos com dois a quatro alelos por loco. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. A similaridade genética foi estimada pelo coeficiente de Dice e a análise de agrupamento pelo método UPGMA, utilizando-se o programa NTSYS e os parâmetros de diversidade foram obtidos pelo programa POPGENE. O coeficiente de similaridade variou de 0,16 a 0,96. A heterozigosidade média observada foi de 0,18 e a esperada de 0,46. Conclui-se que o marcador SSR foi eficiente no estudo da diversidade genética entre os acessos estudados. No segundo ensaio, folhas completamente expandidas de 13 genótipos de mandioca foram coletadas e analisadas quanto às modificações quantitativas em microscopia óptica. Os genótipos apresentaram grande plasticidade anatômica para a maioria dos tecidos foliares e as modificações ocorreram nas características estomáticas, na espessura dos tecidos, no floema e no xilema. Os genótipos UFLA E, IAC 14 e UFLA J se caracterizam por apresentarem adaptabilidade às condições xéricas e os demais genótipos às condições mesófitas. Sendo assim, os genótipos apresentam características desejáveis para diferentes condições ambientais.

Palavras-chave: Variabilidade genética. Plasticidade anatômica. Microssatélites. Anatomia quantitativa.

ABSTRACT

Cassava is found among the main sources of carbohydrates in the world for both food and feed. Consumed both fresh and processed as food or as industrialized products. Various techniques intended to improve the cultivation of cassava have been applied, such as the use of molecular markers and the study of anatomy. This work consists of two experiments. In the first experiment, DNA was amplified 14 microsatellites *primers*, of which 12 were polymorphic and amplified a total of 26 alleles with two to four alleles per loci. The amplification products were separated by polyacrilamide gel electrophoresis. The genetic similarity was estimated by Dice coefficient and cluster analysis by UPGMA, using the NTSYS program. The diversity parameters were achieved using the POPGENE program. The similarity coefficient ranged from 0.16 to 0.96. The average of observed heterozygosity was 0.18 and 0.46 for expected heterozygosity. One can conclude that the SSR marker was efficient in the study of genetic diversity among the accessions studied. In the second experiment, fully expanded leaves of 13 cassava genotypes were collected and analyzed for quantitative changes under optical microscopy. The genotypes showed great anatomical plasticity for most of the leaf tissue, and the changes occurred in stomatal characteristics, thickness of tissues and in the phloem and xylem. Genotypes UFLA E, IAC 14 and UFLA J are characterized by presenting adaptability to xeric conditions and other genotypes to mesophytes conditions. Thus, the genotypes show desirable characteristics for different environmental conditions.

Keywords: Genetic variability. Anatomical plasticity. Microsatellites. Quantitative anatomy.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figure 1 Dendrogram derived from Dice similarity coefficient using UPGMA for the 93 cassava accessions. UFLA, Lavras-MG, 2009..... 50

ARTIGO 2

- Figura 1 Secções transversais das folhas de mandioca (*Manihot esculenta*). ct=cutícula, ead=epiderme da face adaxial, eab=epiderme da face abaxial, pp=parênquima paliçádico, pe=parênquima esponjoso, pl=papila. A=BAIANA, B=UFLA H, C=UFLA G, D=FIBRA, E=UFLA E, F=IAC 15, G=IAC 13, H=MOCOTÓ, I=IAC 12, J=IAC 14, K=BAIANINHA, L=UFLA J, M=OURO DO VALE. Barras=50 µm. 73

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1	Accessions of cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) used in this study and their origins. UFLA, Lavras-MG, 2009.....	44
Table 2	SSR <i>primers</i> used (Chavarriaga-Aguirre et al., 1998), with corresponding sequences and annealing temperature (T_a). UFLA, Lavras-MG, 2009.....	45
Table 3	Number of alleles per locus (A), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e). UFLA, Lavras-MG, 2009	47

ARTIGO 2

Tabela 1	Características das secções paradérmicas da epiderme foliar dos 13 genótipos de mandioca. UFLA, Lavras-MG, 2009	64
Tabela 2	Características dos tecidos foliares dos 13 genótipos de mandioca em secção transversal. UFLA, Lavras-MG, 2009	68

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	A mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	13
2.1.1	Origem, domesticação e diversificação	13
2.1.2	Aspectos botânicos e taxonômicos	14
2.2	Importância da cultura	17
2.3	Melhoramento da mandioca	19
2.4	Marcadores moleculares em mandioca	22
2.5	Estudos anatômicos em mandioca	26
	REFERÊNCIAS	30
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	38
	ARTIGO 1 Genetic diversity among cassava accessions based on SSR markers	38
	ARTIGO 2 Anatomia foliar de genótipos de mandioca em função do potencial para tolerância a diferentes condições ambientais	57

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A mandioca, juntamente com o milho, a cana-de-açúcar e o arroz, constituem as fontes de energia mais importantes das regiões tropicais do mundo. Originária da América do Sul (OLSEN; SCHAAL, 2001), a mandioca foi domesticada por povos pré-colombianos e, desde então cultivada, extensivamente, em zonas tropicais e subtropicais do Continente.

É o quarto produto básico mais importante depois do arroz, trigo e milho e é um componente fundamental na dieta de mais de 500 milhões de pessoas (EL-SHARKAWY, 2006). O principal produto econômico são suas raízes, porém, as folhas possuem excelente potencial, sendo utilizadas no Brasil, África e Ásia, servindo para alimentação humana e animal.

A cultura apresenta grande diversidade genética, que origina continuamente uma infinidade de novos genótipos. No Brasil, existe uma ampla variabilidade genética, mantida em coleções de trabalho e bancos de germoplasma distribuídos em todo o país (FUKUDA; COSTA; SILVA, 2005). O banco de germoplasma de mandioca da Universidade Federal de Lavras (UFLA) é composto por variedades comerciais e por acessos cedidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, que podem ser avaliados quanto à diversidade genética por métodos moleculares e por meio da anatomia foliar como subsídio para programas de melhoramento da Universidade.

Os aspectos anatômicos da mandioca são, ainda, pouco estudados, com escassos trabalhos e os com plantas do gênero demonstram que os tipos de frutos podem variar em relação às diferentes espécies quanto à esclerificação e deiscência (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009). Modificações na anatomia foliar foram detectadas em diferentes cultivares de mandioca, promovendo diferenças

na taxa fotossintética, por modificar a relação área do mesófilo/área foliar, que pode modificar a difusão do CO_2 (EL-SHARKAWY; COCK; PORTO, 1989). Em diferentes cultivares de mandioca foi demonstrado plasticidade para a anatomia foliar, exibindo diferenças nas características estomáticas, como a densidade, que pode indicar cultivares em potencial para a resistência à seca (CERQUEIRA, 1992).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar a diversidade genética e a anatomia foliar de acessos de mandioca pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Federal de Lavras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

2.1.1 Origem, domesticação e diversificação

A origem e domesticação da mandioca há muito é discutida, e a maior parte dos estudos indica os trópicos baixos, entre América do Sul e México. Estudos mais recentes apontam os estados de Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Acre como possíveis regiões brasileiras de domesticação da mandioca (ALLEM, 1987; OLSEN; SCHAAL, 2001). Os conhecimentos suscitados nos últimos anos levaram Allem (1987, 1999) a sugerir os possíveis ancestrais da mandioca: *Manihot esculenta* Crantz ssp. *flabellifolia* (Pohl) e *Manihot esculenta* Crantz ssp. *peruviana* (Mueller Argoviensis).

Carvalho e Schaal (2001), estudando aspectos genéticos e filogenéticos de *Manihot esculenta* ssp. *esculenta*, *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia* e *Manihot pilosa*, confirmaram a proximidade genética entre *Manihot esculenta* ssp. *esculenta* e *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia* e o distanciamento destas de *Manihot pilosa*. Olsen (2004) e Olsen e Schaal (2001) realizaram estudos visando esclarecer a origem da mandioca, nos quais avaliaram características morfológicas, geográficas e filogenéticas. Nestes estudos foram utilizados os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e SSR (*Single Sequence Repeats*). O estudo propôs que a espécie se originou no Sul da Amazônia e que *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia* é a ancestral da espécie cultivada. As últimas pesquisas, envolvendo taxonomia e biosistemática, convergem ao consenso de que a mandioca descende de *Manihot flabellifolia* (ALLEM, 2002; OLSEN, 2004). Magoon, Khishman e Bai (1969) sugerem que as espécies do gênero

Manihot são alotetraploides derivados de duas espécies diploides seguidas de duplicação cromossômica.

A mandioca é uma espécie domesticada por povos pré-colombianos, visando à produção de raízes comestíveis. A domesticação ocorreu, simultaneamente, em várias áreas e, após o descobrimento da América, houve uma rápida dispersão da espécie. No século XVI, os espanhóis e portugueses a introduziram na Ásia e África, onde se desenvolveu com sucesso e, hoje, o continente africano é considerado um centro secundário de diversidade (LEFÉVRE, 1989).

Sua diversificação está concentrada, principalmente, na América Latina e Caribe, em que, aproximadamente, 8.500 acessos são mantidos em coleções por todo o mundo, dos quais 7.500 encontram-se na América do Sul (COSTA; MORALES, 1994). Acredita-se que a maioria desses acessos seja formada por etnovariedades cultivadas em agricultura tradicional (MÜHLEN; MARTINS; ANDO, 2000). O maior centro de diversidade do gênero *Manihot* se encontra no Brasil, em que ocorre cerca de 70% das espécies desse gênero (ROGERS; APPAN, 1973).

2.1.2 Aspectos botânicos e taxonômicos

A mandioca pertence à classe das Eudicotiledôneas, à ordem Malpighiales, à família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*. Neste gênero já foram identificadas mais de 200 espécies (LORENZI; SOUZA, 2005). Dentre as espécies podemos citar: *Manihot esculenta*, *Manihot esculifolia*, *Manihot anomala*, *Manihot caerulescens*, *Manihot glaziovii*, *Manihot carthaginensis*, *Manihot pilosa*, *Manihot tristis*, *Manihot chlorosticta*, dentre outras. A espécie *Manihot esculenta* é a única cultivada, comercialmente, para a produção de raízes comestíveis (DOMINGUEZ; CEBALLOS; FUENTES, 1982).

É uma cultura de ciclo bianual, mas, geralmente, é colhida como anual aos 10-11 meses de idade. Basicamente toda parte da planta pode ser utilizada. O amido das raízes é uma fonte de energia e pode ser fervida ou processada de diferentes formas para o consumo humano e para diferentes propósitos industriais, tais como alimentação animal ou álcool (CEBALLOS et al., 2006).

As folhas são simples e decíduas, inseridas no caule em disposição alterno-espiralada, sua coloração varia entre verde, amarelo e roxo. São constituídas de pecíolo e limbo. O pecíolo apresenta comprimento e coloração variáveis. O limbo é partido, originando lóbulos em número de três a onze, com forma, largura, bordos, cor e comprimento variáveis (CEBALLOS; CRUZ, 2002; CONCEIÇÃO, 1987; SILVA, 2000). As folhas não são amplamente exploradas, apesar do alto valor nutritivo (BABU; CHATTERJEE, 1999) e seu uso na alimentação humana é, relativamente, comum em certos países da África, Ásia e América Latina, devendo, entretanto, serem previamente submetidas ao cozimento ou secagem, para eliminação do princípio tóxico.

O caule é subarborescente ereto, podendo ser indiviso no ciclo vegetativo e ramificado no ciclo reprodutivo. Quando adulto, é lenhoso, quebradiço, apresenta nós salientes e ramificações. Sua coloração é variada, indo do castanho ao prateado (CEBALLOS; CRUZ, 2002; CONCEIÇÃO, 1987; SILVA, 2000). Quando ferido, libera um látex branco e leitoso que, em contato com o ar, coagula, tornando-se pardacento. Em algumas espécies como *Manihot caerulea*, o látex é amarelado, podendo se tornar cor de abóbora, quando coagulado. As espécies *Manihot dichotoma* e *Manihot glaziovii* produzem látex em grande quantidade, o qual é extraído de forma comercial para produção de borracha no nordeste brasileiro (CARVALHO; FUKUDA, 2006).

O sistema radicular apresenta raízes tuberosas, ricas em fécula, com tamanho e formato variados, podendo ser: cilíndricas, cônicas e globosas. Seu número, também, é variável, podendo ocorrer de 5 a 20, porém, em média ocorre

de 5 a 12, dependendo da cultivar. Independente da forma pode ocorrer raízes tortuosas, com estrangulamentos e, ainda, providas de ramificação lateral, características indesejáveis para a indústria. O tamanho ideal para fins industriais é de cerca de 30 a 40 cm, sem defeitos e dotadas de características para os fins a que se destinam. Sua polpa pode ser branca, amarela, creme e rosada, sendo a branca a mais frequente (CEBALLOS; CRUZ, 2002; CONCEIÇÃO, 1987; SILVA, 2000).

As inflorescências são do tipo rácemo ou panícula. As flores masculinas (estaminadas) são menores e em maior número, localizam-se na parte superior das inflorescências, não apresentam corola e o cálice é formado por cinco sépalas de coloração amarelada. Apresentam, ainda, dez estames divididos em dois anéis concêntricos. As flores femininas (pistiladas) são maiores e em menor número que as masculinas, localizam-se na base das inflorescências, apresentam cinco tépalas, ovário súpero trilocular, com estilo curto e estigma com três lobos estigmáticos. O fruto é uma cápsula do tipo tricoca, com uma a três sementes, possui 1,5 cm de comprimento, sofre ataque das moscas das frutas e apresenta deiscência natural. As sementes são carunculadas (CEBALLOS; CRUZ, 2002; CONCEIÇÃO, 1987; SILVA, 2000).

A espécie é monoica, alógama e protogínica, com flores femininas abrindo aos 10-14 dias antes das masculinas na mesma inflorescência. A polinização pode ser feita manualmente, de forma controlada ou por polinização cruzada. A autopolinização é possível, quando se usam flores masculinas e femininas de diferentes ramos ou de diferentes plantas do mesmo genótipo (JENNINGS; IGLESIAS, 2002).

2.2 Importância da cultura

A mandioca é cultivada no Brasil mesmo antes da colonização. Foi domesticada por povos pré-colombianos e desde então cultivada em zonas tropicais e subtropicais do Continente Americano e, segundo dados da Food and Agriculture Organization (FAO), é cultivada em mais de 180 países ao redor do mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2009), em uma área compreendida por uma extensa faixa do globo terrestre, que vai de 30° de latitude Norte a Sul (LORENZI, 2003).

O Brasil está entre os maiores produtores de mandioca do mundo e é responsável por mais de 12,7% dessa produção. Em 2007 a área plantada no país ultrapassou 1,9 milhões de hectares, com produção aproximada de 26,5 milhões de toneladas, com rendimento médio de 14 t.ha⁻¹ (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2008). O país produz cerca de 20,9 milhões de toneladas da raiz. A Nigéria lidera o mercado com 32,7 milhões de toneladas por ano. Segundo a SAGRI (Secretaria de Agricultura), é uma das culturas com maior demanda por mão-de-obra, com 2 milhões de pessoas integradas à cadeia produtiva. Desse modo, é a terceira cultura que mais emprega no país, sendo responsável por 14,2% dos empregos no campo, perdendo somente para o milho, com 18,5%; e para a cana-de-açúcar, com 14,4% (MANDIOCA..., 2010).

Na distribuição da produção pelas regiões geográficas do país, a região Nordeste sobressai-se com uma participação de 36,8% da produção, embora apresente o menor rendimento médio (10,7 t.ha⁻¹). Nas demais regiões, as participações na produção nacional são: Norte (28,7%), Sul (20%), Sudeste (8,8%) e Centro-Oeste (6%). As regiões Sul e Sudeste são as que apresentam os melhores rendimentos, 20,4 t.ha⁻¹ e 18,3 t.ha⁻¹, respectivamente. Os principais

estados produtores são Pará, Bahia, Paraná, Maranhão e Rio Grande do Sul que, em conjunto, são responsáveis por 60,7% da produção do país (IBGE, 2008).

O principal produto econômico são suas raízes, porém, as folhas possuem excelente potencial, sendo utilizadas no Brasil, África e Ásia, servindo para alimentação humana e animal. Caracteriza-se pela grande diversidade de uso e seus produtos podem ser utilizados na indústria, principalmente, considerando sua fécula: fermentada (polvilho), *in natura* (papel, baby-food, álcool, fermento químico, goma para tecidos e tapioca/sagu) e modificada (papelão, pudins, sorvetes, xarope, adoçante, vitamina C e plásticos biodegradáveis) (CEBALLOS, 2002).

É uma das mais importantes fontes de carboidratos e a farinha é a principal forma de utilização no Brasil. As farinhas torradas são consumidas diretamente na mesa, as farinhas de raspa têm fins diversificados, como farinha alimentícia panificável destinando-se, também, para massas (biscoitos, macarrões e similares) em misturas com farinha de trigo. Na alimentação animal pode ser usada a folhagem e a raiz fresca, feno da parte aérea, raspa integral ou farinha integral, raspa residual, farelo de farinha de mesa, farinha de varredura, silagem de mandioca (ALMEIDA; FERREIRA FILHO, 2005; MENDONÇA; MOURA; CUNHA, 2003).

Várias são as cultivares utilizadas, comercialmente e no melhoramento seus objetivos recaem sobre caracteres múltiplos, considerando dois aspectos importantes: o ecossistema e a finalidade de exploração (CEREDA, 2002). O controle e erradicação das doenças (PITA et al., 2001), a adaptação ao stress abiótico, provocado pela seca (CACH et al., 2006), o aumento do valor nutricional e a melhoria na produção industrial são alguns dos objetivos no melhoramento desta cultura (KAWANO, 2003).

Um dos fatores que determina a forma de aproveitamento das raízes é o conteúdo de compostos cianogênicos (HCN), que é variável de uma cultivar para

outra. As variedades com baixos teores de HCN podem ser consumidas *in natura* como podem ser utilizadas para qualquer outra finalidade. As com altos teores, só podem ser consumidas, depois de submetidas a processos de destoxificação, sendo geralmente consumidas na forma de fécula e farinha. Além de baixos teores de HCN, as mandiocas indicadas para mesa devem apresentar sabor agradável, cozimento rápido e estável, maior qualidade da massa cozida, maior tempo de conservação pós-colheita e cor da polpa de raiz de acordo com o costume da região (MEZETTE, 2007; VALLE et al., 2004).

2.3 Melhoramento da mandioca

O melhoramento de mandioca iniciou-se no Brasil, com os trabalhos de Zehntner (1919), no Estado de São Paulo. Em 1935, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) iniciou a exploração da variabilidade entre cultivares locais e, em 1940 iniciou a recombinação por meio de cruzamentos controlados, seguidos de seleção para produtividade, bom padrão culinário, baixo teor de ácido cianídrico e alto teor de matéria seca, além de resistência às doenças (NORMANHA, 1971).

O melhoramento da mandioca tem se desenvolvido em diferentes estágios, tais como: avaliação de variedades locais, coleta e intercâmbio de germoplasma regional e global, recombinação e seleção de clones e uso de espécies silvestres para ampliar a base genética. A partir dos anos 80 a biotecnologia tem sido aplicada para facilitar e aumentar a eficiência do melhoramento. Como consequência, novos horizontes foram abertos para o melhoramento da mandioca (FUKUDA; IGLESIAS; SILVA, 2003). Os objetivos de um programa de melhoramento da mandioca são estabelecidos em função das demandas de produção, processamento e mercado, baseando-se na

resistência a pragas e doenças e, principalmente, no incremento da produtividade de raízes (FUKUDA; SILVA, 2002).

A cultura apresenta grande diversidade genética decorrente da facilidade de polinização cruzada da espécie, de sua alta heterozigosidade e da deiscência abrupta dos frutos, que origina, continuamente, uma infinidade de novos genótipos. No Brasil, existe uma ampla variabilidade genética de mandioca, a qual se encontra mantida em coleções de trabalho e bancos de germoplasma distribuídos em todo o país. Essa variabilidade é representada em sua maioria por variedades locais selecionadas naturalmente ou por agricultores (FUKUDA; COSTA; SILVA, 2005).

O germoplasma de mandioca pode ser conservado, vegetativamente, no campo (*in situ* e *ex situ*) em laboratório (*in vitro*) ou por meio da estocagem de sementes. No Brasil, a maioria das coleções é mantida no campo, apesar de ser a forma mais onerosa, em consequência de oferecer riscos de perdas, principalmente, por ataques de pragas. A vantagem de manter o germoplasma no campo é dispor de material para uso imediato. A conservação *in vitro* é a forma mais efetiva e econômica de preservar o germoplasma, permitindo manter um elevado número de indivíduos ocupando uma pequena área. A conservação em bancos de sementes é menos comum, sendo utilizada, principalmente, para algumas espécies silvestres que apresentam dificuldade de enraizamento por estacas e que não sobrevivem *in vitro*, é usado, exclusivamente, para criar variabilidade em programas de melhoramento (FUKUDA; COSTA; SILVA, 2005).

A caracterização e avaliação do germoplasma são fundamentais. Várias metodologias têm sido propostas, para a caracterização do germoplasma de mandioca e, mais recentemente, foi estabelecida uma padronização na América Latina, na qual consta uma nova relação de descritores para a caracterização morfológica e agronômica da mandioca (FUKUDA; GUEVARA, 1998).

Segundo Costa e Morales (1994), 30% dos acessos mantidos em bancos de germoplasma de mandioca são duplicatas e, para reduzir esta duplicidade, o mais indicado é o estabelecimento de uma coleção nuclear, em que se mantém melhor representatividade da espécie com um número menor de acessos.

Em decorrência do grande número de genótipos cultivados comercialmente, a grande diversidade de ecossistemas existentes e a interação genótipo-ambiente, é difícil uma descrição precisa por descritores morfológicos. Desse modo, adicionou-se a caracterização morfológica, a caracterização molecular, baseada, principalmente, em marcadores moleculares de DNA, a qual tem sido muito utilizada para avaliar a diversidade genética do germoplasma (BEECHING et al., 1993; FREGENE et al., 1994).

A mandioca reproduz-se normalmente por propagação vegetativa, embora ocorra a produção de sementes sexuais, causando diversidade genética. Em função da ampla segregação, as sementes têm sido utilizadas, exclusivamente, em programas de melhoramento genético, para criar variabilidade (SECOND; IGLESIAS, 2000).

O melhoramento genético da mandioca fundamenta-se em técnicas e processos que envolvem hibridações, as quais são realizadas com o uso de dois métodos de polinização: aberta e controlada. Na polinização aberta, destaca-se o policruzamento (FUKUDA; IGLESIAS, 2006). Esse método consiste em possibilitar o intercruzamento natural entre todos os genótipos selecionados, os quais são arranjados em um campo isolado para que não ocorra contaminação com pólen de plantas que não do campo de policruzamento.

Segundo Fukuda (1999), a taxa de cruzamento da mandioca é facilmente manejável, possibilitando tanto a fecundação cruzada quanto a autofecundação. Tratando-se de uma espécie cujas plantas apresentam alta proporção de locos gênicos em heterozigose, ocorre segregação já na geração F_1 , possibilitando ao

melhorista a execução da seleção, mediante plantas obtidas de sementes botânicas, após algumas multiplicações clonais.

A variabilidade clonal, intraespecífica, na mandioca é muito grande, em razão da alta segregação das progênes, características estas fixadas pela propagação vegetativa, propiciando, assim, o aparecimento de numerosas cultivares nas regiões de plantio de mandioca (SALES FILHO, 1991). A classificação e identificação correta das cultivares se faz necessária. O uso de marcadores morfológicos e moleculares possibilita a distinção entre cultivares de mandioca.

2.4 Marcadores moleculares em mandioca

A produção mundial da mandioca vem crescendo nos últimos anos, porém, o rendimento da cultura não acompanha esse crescimento, havendo a necessidade de aumentar a produtividade e melhorar a qualidade dos produtos para atender as exigências do mercado mundial. Dentro deste contexto, os marcadores moleculares contribuem de maneira significativa no sentido de facilitar a seleção de materiais promissores nos programas de melhoramento, visando aumentar a produtividade e qualidade dos produtos obtidos, valor proteico, resistência a patógenos e tolerância a pragas. São de grande importância na caracterização e identificação de acessos mantidos em bancos de germoplasma, cujo objetivo principal é a manutenção da variabilidade genética e a utilização dos mesmos (FARALDO et al., 2002).

Existem vários tipos de marcadores, entre eles: marcadores isoenzimáticos, marcadores de DNA (RFLP) e marcadores de DNA baseados em PCR (microsatélites, RAPD e AFLP). A análise de isoenzima é a maneira mais rápida e direta de avaliar, genotipicamente, muitos locos em um grande número de indivíduos. Tem sido bastante utilizada nos estudos de variação

genética em mandioca. Sua aplicação tem sido realizada para diferentes finalidades no gênero *Manihot*. A técnica de eletroforese de isoenzimas vem sendo utilizada desde 1950 (SMITHIES, 1955), para estimar e avaliar o grau de variabilidade genética em populações naturais, fluxo gênico, hibridação, relação filogenética.

Os marcadores de DNA permitem a identificação precisa do genótipo, sem o efeito do meio ambiente, aumentando a herdabilidade. Também contribuem para a redução do efeito de grandes populações melhoradas no estágio de plântulas baseado no ‘critério mínimo de seleção’ (MEUWISSEN; HAYES; GODDARD, 2001). Outra aplicação é a redução na duração do tempo requerido para a introgressão de características de parentes silvestres os quais possuem importantes fontes de genes para resistência a pragas e doenças (CHAVARRIAGA et al., 2004). Existe, porém, a necessidade de reduzir ou eliminar o teor do genoma doador indesejável que pode prolongar o processo, tornando-se impraticável para a maioria dos melhoristas. O emprego de marcadores de DNA, no melhoramento de mandioca, é baseado considerando a herdabilidade de uma característica e a soma da diferença genotípica explicada pelo marcador.

O desenvolvimento das técnicas de marcadores de DNA, por meio de RFLP, propiciou avanço significativo no conhecimento de biosistemática, evolução e genética de plantas e animais. A associação entre a técnica e as regiões com variabilidade têm possibilitado avanços nos estudos de genética de populações, biogeografia e polimorfismo em populações de diversos organismos, principalmente, em populações humanas, nas quais se aplica a medicina forense, determinação de paternidade e diagnóstico de doenças hereditárias (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Apresentam as seguintes vantagens em relação aos marcadores isoenzimáticos: são herdados como marcadores mendelianos livres de efeitos pleiotrópicos; não são afetados

pelo ambiente; podem ser obtidos em número elevado e têm distribuição aleatória no genoma.

O desenvolvimento da técnica de PCR aumentou a eficiência de detecção de polimorfismo em nível de DNA e RNA e além disso reduziu o tempo de execução dos experimentos, custo e complexidade. A PCR se aplica a vários campos da biologia, incluindo genética, botânica, entomologia, metodologias para identificação de material transgênico nos alimentos. Atualmente, é uma técnica amplamente difundida e a mais utilizada na análise de polimorfismo (FARALDO et al., 2002).

Nos eucariotos, os genomas, são povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*. Essas regiões são chamadas de microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*). As repetições encontradas são divididas em: repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; repetições compostas, quando duas ou mais repetições de microssatélites estão dispostas adjacentes; e repetições simples, quando o microssatélite é formado por apenas uma repetição. As repetições simples e compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (CAIXETA et al., 2009).

As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, por PCR, fragmentos que contêm o DNA repetido em todos os genótipos. Os produtos da amplificação são observados em gel de poliacrilamida ou gel de agarose de alta resolução e visualizados por meio de coloração com brometo de etídio ou nitrato de prata (CAIXETA et al., 2009). As principais características desses marcadores: alta frequência e ampla dispersão pelo genoma, serem codominantes, apresentarem segregação

mendeliana e por não dependerem de grandes quantidades de DNA para serem analisados via PCR (CAIXETA et al., 2009; FARALDO et al., 2002).

Para estudos de polimorfismo, duas metodologias podem ser utilizadas: hibridação por sondas que contenham sequências repetitivas; e amplificação por PCR de locos contendo microssatélites, sendo esta a mais utilizada. Em estudos com mandioca, tem sido utilizado para detecção de polimorfismo; estudos de evolução, origem e domesticação (OLSEN; SCHAAL, 2001), relações filogenéticas (CARVALHO; SCHAAL; FUKUDA, 2000); grau de parentesco entre espécies silvestres do gênero *Manihot* e a espécie cultivada (CABRAL; CARVALHO; SCHAAL, 2000); construção de mapas genéticos; caracterização; estudos de herança e variabilidade (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 2000), mapeamento do genoma (FREGENE et al., 2000) e; caracterização e identificação de acessos e etnovarietades presentes em bancos de germoplasma (CARVALHO; SCHAAL, 2001; MÜHLEN, 1999).

O RAPD baseia-se na amplificação de regiões anônimas dispersas pelo genoma. O tamanho do *primer* é menor (10 nucleotídeos) que o utilizado em PCR específico (20 nucleotídeos). Porém, existe dificuldade de padronização, uma vez que deve existir discriminação exata entre a presença de um sítio RAPD que hibridiza com o *primer* para que o polimorfismo possa ser detectado e, também, as alterações dos resultados em função das condições do PCR. A concentração do $MgCl_2$, de DNA molde e de nucleotídeos na solução; temperatura de anelamento; tipo de polimerase; tipo de termociclador e a composição e comprimento dos iniciadores estão entre os principais fatores que afetam o padrão de bandas (MÜHLEN, 1999).

O polimorfismo é caracterizado quando há presença de banda em um indivíduo e ausência em outro após a amplificação e eletroforese. É um marcador dominante e são amplificados, ao mesmo tempo, mais de uma região do genoma, não havendo distinção entre bandas de um mesmo loco com

diferentes alelos e entre bandas provenientes de locos diferentes (CHARMERS et al., 1992; WILLIAMS et al., 1993). Não há distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, a amplificação ocorre para os dois tipos de indivíduos, pois, o fenótipo molecular de ambos são semelhantes e é caracterizado pela visualização de apenas uma banda. Esta técnica, para mandioca, é utilizada para avaliar o nível de diversidade genética (CARVALHO; SCHAAL; FUKUDA, 2000; COLOMBO; SECOND; VALLE, 2000; MÜHLEN, 1999) e para construção de mapas genéticos (FREGENE et al., 2000).

O AFLP foi proposto por Eck et al. (1995) e Vos et al. (1995), baseando-se na amplificação do DNA via PCR para detectar diferenças em um conjunto de fragmentos selecionados e digeridos por enzimas de restrição. Envolve as seguintes etapas: digestão do DNA genômico total com duas endonucleases de restrição; ligação de adaptadores com sequência conhecida nas duas extremidades de cada fragmento; amplificação seletiva do conjunto de fragmentos usando *primers* com sequência complementar a sequência do adaptador seguida de sequência específica do sítio de restrição da enzima e uma extensão de nucleotídeos seletivos na extremidade 3' (BORÉM; CAIXETA, 2009).

2.5 Estudos anatômicos em mandioca

A família Euphorbiaceae, segundo Metcalfe e Chalk (1950), apresenta extensa variação na estrutura anatômica da folha em virtude da diversidade no hábito das plantas. Esses autores relatam que as folhas apresentam, de forma geral, estrutura interna com modificações, tricomas glandulares e não glandulares, de forma e densidade variáveis. A epiderme é formada por células retas de paredes anticlinais sinuosas, com presença ou não de células

mucilaginosas e salicificadas. Na face abaxial, a epiderme pode ser papilosa com estômatos do tipo paracítico, os quais raramente ocorrem em ambas as faces. O mesofilo apresenta parênquima paliçádico e lacunoso. O paliçádico apresenta uma camada de células alongadas dispostas, perpendicularmente, à superfície da lâmina foliar e o lacunoso apresenta forma e tamanho variável, com células esféricas e espaços intercelulares, formando um tecido frouxo. Os feixes vasculares estão acompanhados, algumas vezes, por esclerênquima ou por uma camada de células grandes do parênquima.

O limbo foliar de *Manihot esculenta*, segundo Viegas (1976), em secção transversal, apresenta epiderme com tricomas unicelulares longos. O mesofilo é dorsiventral com parênquima lacunoso constituído de células poliédricas dispostas em quatro camadas com grandes espaços intercelulares, e os estômatos ocorrem nas duas faces. Ocorre, ainda, a presença de vasos laticíferos que aparecem entre as células parenquimatosas do floema, que crescem cenociticamente por entre o tecido frouxo ocorrendo anastomoses.

Estudos realizados por Mendonça (1983), sobre os aspectos anatômicos e a distribuição de laticíferos na folha e na casca de *Manihot caerulea*, revelam grande semelhança na anatomia desta espécie com *Hevea brasiliensis*, *Manihot dichotoma* e *Manihot glaziovii*. Mendonça (1992) realizou os mesmos estudos em *Manihot glaziovii* e constatou que a distribuição dos vasos laticíferos é muito semelhante à encontrada em *Manihot caerulea* e *Hevea brasiliensis*, os quais estão distribuídos no pecíolo, logo abaixo da epiderme, na camada do colênquima, no floema e nas proximidades da medula. No mesofilo, estão associados ao sistema vascular, próximo ao floema, abaixo da epiderme e no colênquima.

Nas euforbiáceas ocorrem dois tipos de laticíferos: os articulados, que resultam de cadeias longitudinais de células e formam os vasos laticíferos e os não-articulados, que se formam de células individuais em consequência do

crescimento contínuo e originam estruturas tubulares chamadas células laticíferas (ESAU, 1985; MAUSETH, 1988). O laticífero articulado pode ser não anastomosado, pois, formam cadeias de tubos não conectados e anastomosados por se conectar em outros vasos. É encontrado no gênero *Manihot* (MAUSETH, 1988). Pesquisas concentradas nos aspectos fisiológicos visam esclarecer os caminhos fotossintéticos dos tipos C_3 ou C_4 e a presença da estrutura Kranz na folha de *Manihot esculenta*, e tais pesquisas têm sido discutidas de modo a justificar a maior produtividade da mandioca (EL-SHARKAWY; COCK, 1987; EL-SHARKAWY; TAFUR; CADAVID, 1992, 1993).

De acordo com Metcalfe (1979), nas nervuras das folhas de algumas angiospermas, os feixes vasculares estão completa ou parcialmente circundados por células parenquimatosas clorofiladas, em uma ou mais camadas, formando uma bainha distinta. A presença ou ausência desta bainha serve para identificar plantas com anatomia Kranz. O mesmo autor considera que a estrutura Kranz pode divergir muito e sugeriu que investigações bioquímicas sobre a fixação de CO_2 pela via C_3 ou C_4 devem ser acompanhadas de estudos anatômicos de forma a demonstrar a presença ou não desta estrutura.

A geometria do tecido interno das folhas de *Manihot esculenta* foi interpretada por El-Sharkawy, Cock e Cadena (1984) visando investigar a difusão do CO_2 e determinar a atividade fotossintética nos tecidos do mesófilo. Observaram que o parênquima paliçádico ocupa 50% ou mais em volume no mesófilo e o lacunoso 30% ou menos. El-Sharkawy e Cock (1987) relataram um mecanismo eficiente de reciclagem de CO_2 no parênquima paliçádico de mandioca. Neste tecido, foram encontrados ácidos resultantes do metabolismo C_4 e verificaram que as células ao redor do feixe vascular e que formam uma bainha conpíscua, não são semelhantes às encontradas nas plantas C_4 . Sendo assim, sua anatomia foliar não pode ser considerada do tipo Kranz. A bainha do

feixe vascular da mandioca é clorofilada, podendo ser considerada como um intermediário natural entre espécies C_3 e C_4 e as variações na anatomia da folha podem aumentar a expressão do ciclo C_4 (EL-SHARKAWY; COCK, 1990).

REFERÊNCIAS

ALLEM, A. C. Cassava: biology, production and utilization. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTII, A. C. (Ed.). **The origins and taxonomy of cassava**. Greenwich: University of Greenwich, 2002. p. 1-16.

_____. Closest wild relatives of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, Netherlands, v. 107, n. 2, p. 123-133, Apr. 1999.

_____. *Manihot esculenta* as a native of the neotropics. **Plant Genetic Resource**, Cambridge, v. 71, n. 1, p. 22-24, Jan. 1987.

ALMEIDA, J.; FERREIRA FILHO, J. R. Mandioca: uma boa alternativa para alimentação animal. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 50-56, 2005.

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, R. F. L. P. O emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismo no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. Cap. 14, p. 143-161.

BABU, L.; CHATTERJEE, S. R. Protein content and amino acid composition of cassava tubers and leaves. **Journal of Root Crops**, Kerala, v. 25, n. 20, p. 163-168, 1999.

BEECHING, J. R. et al. An assesment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasma using molecular markers. **Annals of Botany**, Oxford, v. 72, n. 6, p. 515-520, Dec. 1993.

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

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

CACH, N. T. et al. Inheritance of useful traits in cassava grown in subhumid conditions. **Plant Breeding**, Berlin, v. 125, n. 2, p. 177-182, June 2006.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasma collecting in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, n. 1, p. 133-142, Jan. 2001.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. Phenetic relationships and genetic diversity among cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces revealed by PCR-based markers. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 65-79.

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

CEBALLOS, H. La Yuca en Colombia y el Mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenário. In: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (Coord.). **La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización**. Cali: CIAT, 2002. Cap. 1, p. 1-13 (Publicación CIAT, 327).

CEBALLOS, H.; CRUZ, G. A. Taxonomia y morfologia de la yuca. In: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (Coord.). **La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización**. Cali: CIAT, 2002. p. 16-32.

CEBALLOS, H. et al. Development and identification of high-value cassava clones. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 703, n. 1, p. 63-70, Feb. 2006.

CEREDA, M. P. **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 540 p.

CERQUEIRA, Y. M. Efeito da deficiência de água na anatomia foliar de cultivares de mandioca *Manihot esculenta* Crantz: I., densidade estomática. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 10, p. 103-115, 1992.

CHARMERS, K. J. et al. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers. **Heredity**, Essex, v. 69, n. 5, p. 465-472, Nov. 1992.

CHAVARRIAGA, P. et al. Screening transgenics unveils apparent resistance to hornworm (*E. ello*) in the non-transgenic, African cassava clone 60444. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY, 6., 2004, Cali. **Proceedings...** Cali: CIAT, 2004. p. 4.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. et al. Microsatellite in cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae): discovery, inheritance, variability and using for germoplasm characterization. In: CASSAVA BIOTECHNOLOGY INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 147-167.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T. L. Os marcadores moleculares AFLP e RAPD no estudo da diversidade genética de mandiocas (*Manihot esculenta*, Crantz). In: CASSAVA BIOTECHNOLOGY INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 93-101.

CONCEIÇÃO, A. J. **A mandioca**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1987. 382 p.

COSTA, I. R. S.; MORALES, E. A. V. Cassava genetics in South America. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, 1., 1992, Cali. **Proceedings...** Rome: IPGRI, 1994. p. 16-20.

DOMINGUEZ, C. E.; CEBALLOS, L. F.; FUENTES, C. Morfología de la planta de yuca. In: _____. **Yuca investigación, producción y utilización**. Cali: CIAT, 1982. p. 29-49.

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

EL-SHARKAWY, M. A.; COCK, J. H. C₃-C₄ intermediate photosynthetic characteristics of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) I. Gas exchange. **Photosynthesis Research**, New York, v. 12, n. 3, p. 219-235, Jan. 1987.

_____. Photosynthesis of cassava (*Manihot esculenta*). **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 26, n. 3, p. 325-340, Jul. 1990.

EL-SHARKAWY, M. A.; COCK, J. H.; CADENA, G. Influence of differences in leaf anatomy on net photosynthetic rates of some cultivars of cassava.

Photosynthesis Research, New York, v. 5, n. 3, p. 235-242, Sep. 1984.

EL-SHARKAWY, M. A.; COCK, J. H.; PORTO, M. C. M. Características fotossintéticas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 1, n. 2, p. 143-154, 1989.

EL-SHARKAWY, M. A.; TAFUR, S. M.; CADAVID, L. F. Photosynthesis of cassava and its relations to crop productivity. **Photosynthetica**, Prague, v. 28, p. 431-438, 1993.

_____. Potential photosynthesis of cassava as affected by growth conditions. **Crop Science**, Stanford, v. 32, n. 6, p. 1336-1342, Dec. 1992.

ESAU, K. **Anatomia vegetal**. Barcelona: Omega, 1985. 779 p.

FARALDO, M. I. F. et al. Marcadores moleculares em mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 101-117. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, 2).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistical databases**. Roma, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 5 mar. 2010.

FREGENE, M. et al. AFLP analysis of African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm resistant to the cassava mosaic disease (CMD). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 5, p. 678-685, Oct. 2000.

_____. Variability of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 719-727, Dec. 1994.

FUKUDA, W. M. G. Melhoramento de mandioca. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 409-428.

FUKUDA, W. M. G.; COSTA, I. R. S.; SILVA, S. O. **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 2005. 4 p. (Circular Técnica, 74).

FUKUDA, W. M. G.; GUEVARA, C. L. **Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1998. 39 p. (Documentos, 78).

FUKUDA, W. M. G.; IGLESIAS, C. Melhoramento da mandioca. In: SOUZA, L. S. et al. (Ed.). **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. Cap. 13, p. 324-363.

FUKUDA, W. M. G.; IGLESIAS, C.; SILVA, S. O. **Melhoramento da mandioca**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2003. 53 p. (Documentos, 104).

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. E. Melhoramento de mandioca no Brasil. In: CEREDA, M. P. (Ed.). **Cultura de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 242-257.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 5 mar. 2010.

JENNINGS, D. L.; IGLESIAS, C. Breeding for crop improvement. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Ed.). **Cassava: biology, production and utilization**. Cambridge: CABI, 2002. p. 149-166.

KAWANO, K. Thirty years of cassava breeding for productivity: biological and social factors for success. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 4, p. 1325-1335, Apr. 2003.

LEFÉVRE, F. **Resources génétiques et amelioration du manioc, *Manihot esculenta* Crantz en Afrique**. Paris: Orstom, 1989, 175 p. (TDM Orstom, 57).

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

LORENZI, J. O. **Mandioca**. Campinas: CATI, 2003. 116 p. (Boletim Técnico, 245).

MAGOON, M. L.; KHISHMAN, R.; BAI, K. V. Morphology of the pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia**, Tokyo, v. 34, n. 4, p. 612-626, 1969.

MANDIOCA agora entra no ciclo industrial. Disponível em:
<<http://www.noticiasdaamazonia.com.br/5430-mandioca-agora-entra-no-ciclo-industrial/>>. Acesso em: 16 fev. 2010.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Davis: Cummings, 1988. 560 p.

MENDONÇA, H. A.; MOURA, G. M.; CUNHA, E. T. Avaliação de genótipos de mandioca em diferentes épocas de colheita no Estado do Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 761-769, Jun. 2003.

MENDONÇA, M. S. Estudo de plantas laticíferas I: aspectos anatômicos e distribuição de vasos laticíferos em *Manihot caerulencens* Pohl. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 13, n. 3/4, p. 501-517, 1983.

_____. Estudo de plantas laticíferas II: aspectos anatômicos e distribuição de vasos laticíferos em *Manihot glaziovii* Muller Arg. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 22, n. 3, p. 309-321, 1992.

METCALFE, C. R. The leaf: general topography and ontogeny of the tissues. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons**. Oxford: Clarendon, 1979. v. 1, p. 63-75.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon, 1950. p. 1207-1227.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, Washington, v. 157, n. 4, p. 1819-1829, Apr. 2001.

MEZETTE, T. F. **Seleção de clones de mandioca com alto teor de carotenóides e vitamina A**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz)**. 1999. 176 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1999.

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

NORMANHA, E. S. O trabalho de melhoramento da mandioca no Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 23, p. 91-100, 1971.

OLIVEIRA, J. H. G.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do pericarpo de *Manihot caerulea* Phol. e *Manihot tripartita* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 117-119, Jan./Fev. 2009.

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n. 4, p. 517-526, Apr. 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**, Madison, v. 88, n. 1, p. 131-142, Jan. 2001.

PITA, J. S. et al. Genomic and biological diversity of the African cassava geminiviruses. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, n. 1, p. 115-125, June 2001.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae). **Flora Neotropica**, New York, v. 13, p. 1-272, 1973.

SALES FILHO, J. B. **Caracterização de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pela morfologia de padrões enzimáticos**. 1991. 118 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1991.

SECOND, G.; IGLESIAS, C. The state of the use of cassava genetic diversity and a proposal to enhance it. In: COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. (Ed.). **Broadening the genetic base of crop production**. Olson: CABI, 2000. p. 201-222.

SILVA, R. M. **Sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade em roça de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2000. 131 p. Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2000.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels. **Biochemical Journal**, Auckland, v. 61, p. 629-641, 1955.

VALLE, T. L. et al. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 221-226, 2004.

VANECK, H. J. et al. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. **Molecular Breeding**, Netherlands, v. 1, n. 4, p. 397-410, Aug. 1995.

VIEGAS, A. P. **Estudos sobre mandioca**. São Paulo: Instituto Agronômico, 1976. 214 p.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, Oct. 1995.

WILLIAMS, J. G. K. et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, New York, v. 218, n. 51 p. 704-740, 1993.

ZEHNTNER, L. **Estudo sobre algumas variedades de mandiocas brasileiras**. Rio de Janeiro: Sociedad Nacional de Agricultura, 1919. 61 p.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**GENETIC DIVERSITY AMONG CASSAVA ACCESSIONS BASED ON
SSR MARKERS**

**Prepared in agreement with Crop Breeding and Applied Biotechnology –
Preliminary version**

Genetic diversity among cassava accessions based on SSR markers

ABSTRACT – The genetic diversity of cassava is expressed in about 7000 varieties found around the world and this diversity has been characterized more efficiently by means of molecular markers, which also enable multiple applications and genetic analysis with great opportunities for use in breeding. The aim of this study was to characterize and estimate the genetic similarity among 93 cassava accessions from the germplasm bank of the Federal University of Lavras (UFLA). The DNA amplification was performed with 14 microsatellite *primers*. The amplification products were separated by a polyacrylamide gel electrophoresis, showing a polymorphism formation, through which the accessions were discriminated against. The genetic similarity among accessions of cassava was estimated by the Dice coefficient. Cluster analysis was carried out using the UPGMA method through the NTSYS program. Of the 14 *primers*, 12 were polymorphic and amplified a total of 26 alleles with 2-4 alleles per loci. The genetic similarity between accessions ranged from 0.16 to 0.96. The highest genetic similarity was observed among accessions UFLA 9 and DESCONHECIDO 3, UFLA 25 and LT 3, IAC 12 and UFLA 73, while the lowest was observed between UFLA 60 and UFLA 76. The genetic diversity parameters were estimated using the POPGENE program. The average values for observed and expected heterozygosity were 0.18 and 0.46, respectively. One can conclude that the SSR marker was efficient in the study of genetic diversity among the accessions studied.

Key words: *Manihot esculenta*, microsatellites, genetic characterization.

Diversidade genética entre acessos de mandioca com base em marcadores SSR

RESUMO – A diversidade genética da mandioca se expressa em cerca de 7000 variedades encontradas em todo o mundo e essa diversidade tem sido caracterizada mais eficientemente por meio de marcadores moleculares. Objetivou-se caracterizar e estimar a similaridade genética entre 93 acessos de mandioca do banco de germoplasma da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A amplificação do DNA foi realizada com 14 *primers* microssatélites. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, evidenciando-se a formação de bandas polimórficas, por meio das quais os acessos foram discriminados. A similaridade genética entre os acessos de mandioca foi estimada por meio do coeficiente de Dice. A análise de agrupamento foi feita com o método UPGMA, utilizando-se o programa NTSYS. Foram amplificados um total de 26 alelos com 2 a 4 alelos por loco. O coeficiente de similaridade genética variou de 0,16 a 0,96. Os parâmetros de diversidade genética foram estimados usando o programa POPGENE. Os valores médios para heterozigosidade observada e esperada foram 0,18 e 0,46, respectivamente. Pode-se concluir que o marcador SSR foi eficiente no estudo da diversidade genética entre os acessos estudados.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*, microssatélites, caracterização genética.

INTRODUCTION

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is the staple food of nearly 700 million people worldwide. It is the only species of the genus *Manihot* grown commercially for the production of edible roots. It adapts to different climate and soil conditions and can be found from the Southern U.S. to northern Argentina. Generally, it is planted in marginal areas with low productivity (Fukuda and Iglesias, 2006).

The species has a large genetic diversity due to the ease of pollination, high heterozygosity and sudden dehiscence of the fruit, leading to a continuously infinite number of new genotypes, even considering that the cultivation of cassava is by vegetative propagation through stem segments, called 'cuttings'. In Brazil, the wide genetic variability of cassava is kept in on-site collections and germplasm banks distributed throughout the country. This variability is represented mostly by native varieties or those naturally selected by farmers (Fukuda et al., 2005).

The conservation of cassava germplasm is essential in reducing the genetic erosion of species and genetic diversity available to help to improve the culture. In cassava this erosion is mainly due to the expansion of agricultural frontiers, the advancement of urbanization, and the biotic and abiotic stresses and to a lesser extent, by the replacement of traditional varieties by improved varieties (Fukuda et al., 1996). The characterization of the species diversity is important for germplasm conservation. Estimating the degree of relatedness between accessions makes it possible to eliminate possible duplicates and more efficient use of them in breeding programs.

The DNA markers are useful in studies of evolution, domestication, ecology and phylogeny of plants and also for genetic mapping and cloning of genes. Therefore, allowing a short term evaluation of a large number of

genotypes, without environmental influence (Costa et al., 2003). The use of molecular markers in assessing the genetic diversity of cassava germplasm has been increasing in recent years, mainly due to the large amount of information concerning the genome of this species available (Colombo et al., 2000; Mühlen et al., 2000; Carvalho and Schaal, 2001; Elias et al. 2001; Mba et al., 2001; Zaccarias et al., 2004; Elias et al., 2004).

As cited by Faraldo et al. (2002), the molecular markers are very important techniques for the identification of accessions held by germplasm banks, whose purpose is to maintain genetic variability for subsequent use of the accessions. One type of molecular marker that is more informative in evaluating cassava germplasm is a microsatellite (Chavarriaga-Aguirre et al., 1998). Microsatellites have short sequences that are repeated in *tandem* in a specific locus and express extensive polymorphism. The main characteristics of microsatellites is their high frequency, wide dispersion in the genome and high mutation rate at which they are exposed, resulting in great variability, and also the fact that they are co-dominant and present Mendelian inheritance (Faraldo et al., 2002).

The aim of this study was to estimate the genetic variability among 93 accessions of cassava from the germplasm bank at the Federal University of Lavras for 14 microsatellite *primers*, enabling the identification of genetically divergent clones for polycrossing, aiming at the development of new clones.

MATERIAL AND METHODS

Part of the accessions held in the germplasm bank at UFLA was provided by Embrapa Cassava and Fruit Crops, Cruz das Almas, BA. These clones were used in field polycrossing, from where the new clones were obtained, which together with some commercial cultivars were evaluated in this study (Table 1).

Molecular analyses were performed at the Molecular Genetics Laboratory, Department of Biology (DBI) Federal University of Lavras.

Table 1 Accessions of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) used in this study and their origins. UFLA, Lavras-MG, 2009

CÓDIGO	ORIGEM	ACESSO	CÓDIGO	ORIGEM	ACESSO	CÓDIGO	ORIGEM	ACESSO
1	LAVRAS/MG	BAIANA	32	LAVRAS/MG	UFLA 5	63	LAVRAS/MG	UFLA 31
2	LAVRAS/MG	UFLA 7	33	CAMPINAS/SP	IAC 13	64	CARRANCAS/MG	AMARELINHA
3	LAVRAS/MG	CASCA ROXA	34	LAVRAS/MG	SEIS MESES	65	LAVRAS/MG	UFLA 49
4	LAVRAS/MG	UFLA H	35	LAVRAS/MG	UFLA 76	66	LAVRAS/MG	UFLA 12
5	LAVRAS/MG	UFLA 30	36	LAVRAS/MG	LT 2	67	LAVRAS/MG	UFLA 58
6	LAVRAS/MG	UFLA 4	37	CAMPINAS/SP	MOCOTÓ	68	LAVRAS/MG	UFLA 71
7	LAVRAS/MG	UFLA 48	38	LAVRAS/MG	UFLA 57	69	LAVRAS/MG	UFLA 36
8	LAVRAS/MG	UFLA 42	39	LAVRAS/MG	UFLA 11	70	LAVRAS/MG	UFLA 53
9	LAVRAS/MG	UFLA 90	40	LAVRAS/MG	UFLA 65	71	PATOS DE MINAS/MG	MANABOW
10	LAVRAS/MG	UFLA 2	41	LAVRAS/MG	UFLA 18	72	LAVRAS/MG	UFLA 28
11	CAMPINAS/SP	IAC 576 60	42	LAVRAS/MG	UFLA 61	73	LAVRAS/MG	UFLA 77
12	LAVRAS/MG	UFLA 63	43	CAMPINAS/SP	IAC 12	74	LAVRAS/MG	UFLA 73
13	LAVRAS/MG	UFLA 33	44	LAVRAS/MG	UFLA 23	75	LAVRAS/MG	UFLA 10
14	LAVRAS/MG	UFLA 59	45	LAVRAS/MG	UFLA 8	76	LAVRAS/MG	UFLA 46
15	LAVRAS/MG	UFLA G	46	LAVRAS/MG	JB	77	LAVRAS/MG	UFLA 60
16	LAVRAS/MG	UFLA 25	47	LAVRAS/MG	UFLA 64	78	LAVRAS/MG	UFLA 26
17	LAVRAS/MG	LT 4	48	LAVRAS/MG	UFLA 13	79	LAVRAS/MG	UFLA 32
18	LAVRAS/MG	UFLA 9	49	LAVRAS/MG	UFLA 51	80	LAVRAS/MG	UFLA 20
19	LAVRAS/MG	UFLA 19	50	LAVRAS/MG	UFLA 60	81	LAVRAS/MG	UFLA 72
20	LAVRAS/MG	UFLA 41	51	CAMPINAS/SP	IAC 14	82	LAVRAS/MG	UFLA 29
21	LAVRAS/MG	DESCONHECIDO 3	52	LAVRAS/MG	UFLA 66	83	CAMPINAS/SP	OURO DO VALE
22	CAMPINAS/SP	FIBRA	53	LAVRAS/MG	UFLA 21	84	LAVRAS/MG	UFLA 62
23	LAVRAS/MG	UFLA E	54	CARRANCAS/MG	PINHEIRA	85	LAVRAS/MG	UFLA 67
24	LAVRAS/MG	UFLA 47	55	LAVRAS/MG	UFLA 75	86	LAVRAS/MG	UFLA 22
25	LAVRAS/MG	LT 1	56	LAVRAS/MG	UFLA 17	87	LAVRAS/MG	UFLA 38
26	LAVRAS/MG	LT 3	57	LAVRAS/MG	UFLA 27	88	LAVRAS/MG	BAIANA II
27	LAVRAS/MG	UFLA 16	58	LAVRAS/MG	UFLA 24	89	IAPAR/PR	PIONEIRA
28	LAVRAS/MG	UFLA 39	59	LAVRAS/MG	BAIANINHA	90	CAMPINAS/SP	IAC 576 70
29	LAVRAS/MG	UFLA 52	60	LAVRAS/MG	UFLA 15	91	CAMPINAS/SP	MOCOTÓ
30	LAVRAS/MG	UFLA 40	61	LAVRAS/MG	UFLA J	92	LAVRAS/MG	PÃO DA CHINA
31	CAMPINAS/SP	IAC 15	62	LAVRAS/MG	UFLA 45	93	CONFRESA/MT	NI

DNA samples of each accession were extracted according to the procedure used by Pereira et al. (2007). Subsequently the DNA was used for PCR amplification. In the amplification, 14 microsatellite *primers* predetermined by Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) (Table 2) were used. The amplification reactions were performed in 0.2 mL microtubes, using a BioCycle model thermal cycler, through the following program: one step at 95°C for two minutes for initial denaturation, followed by 32 cycles of 94°C for 20 seconds each for DNA denaturation, 40 seconds for the annealing of *primer* at 47°C, 40 seconds for extension at 72°C, followed by a final extension at 72°C for four minutes.

Table 2 SSR *primers* used (Chavarriaga-Aguirre et al., 1998), with corresponding sequences and annealing temperature (T_a). UFLA, Lavras-MG, 2009

PRIMER	PRIMER SEQUENCE (5' → 3')	T_a (°C)
GA-5	TAATGTCATCGTCGGCTTCG	47
	GCTGATAGCACAGAACACAG	
GA-12	GATTCCTCTAGCAGTTAAGC	47
	CGATGATGCTCTTCGGAGGG	
GA-13	TTCCCTCGCTAGAACTTGTC	47
	CTATTGACCGTCTTCGCCG	
GA-16	GTACATCACCACCAACGGGC	47
	AGAGCGGTGGGGCGAAGAGC	
GA-21	GGCTTCATCATGGAAAAACC	47
	CAATGCTTTACGGAAGAGCC	
GA-57	AGCAGAGCATTTACAGCAAGG	47
	TGTGGAGTTAAAGGTGTGAATG	
GA-123	CAATGCAGGTGAAGTGAATACC	47
	AGGGTGCTCTTCAGAGAAAGG	
GA-126	AGTGGAATAAGCCATGTGATG	47
	CCCATAATTGATGCCAGGTT	
GA-127	CTCTAGCTATGGATTAGATCT	47
	GATGCTTCGAGTCGTGGGAGA	
GA-131	TTCCAGAAAGACTTCCGTTCA	47
	CTCAACTACTGCACTGCACTC	
GA-134	ACAATGTCCCAATTGGAGGA	47
	ACCATGGATAGAGCTCACCG	
GA-136	CGTTGATAAAGTGGAAGAGCA	47
	ACTCCACTCCCGATGCTCGC	
GA-140	TTCAAGGAAGCCTTCAGCTC	47
	GAGCCACATCTACTCGACACC	
GA-161	TGTTCTTGATCTTCTGCTGCA	47
	TGATTGTGGACGTGGGTAGA	

After amplification, the reaction products were separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide gel in TBE buffer at a current of 130 V for two hours. The DNA fragments were stained with silver nitrate and photographed with a Sony Cyber-shot DSC-W30 digital camera.

The identification of DNA fragments amplified by microsatellite markers was done by performing a visual analysis. Each microsatellite band was evaluated for the 93 accesses, identifying the presence of a band by 1 and for an absence by 0. From the matrix 0 and 1 genetic similarity (sg_{ij}) was estimated between all pairs of genotypes using the Dice coefficient (Dice, 1945): $sg_{ij} = 2a/(2a+b+c)$, which **a** corresponds to the presence of a band on the individual *i* and *j*; **b** represents the presence of the band in *i* and absence in *j*; and **c** represents the absence of the band in *i* and presence in *j*. Analyses of similarity were performed using the program NTSYS version 2.1 (Rohlf, 2000). Based on the coefficient similarity, the genotypes were clustered by UPGMA and represented in a dendrogram. The genetic difference among accessions was identified in the dendrogram given the estimate of the maximum significant similarity (sgm). The sgm was estimated by t-test obtained by the expression: $sgm = 1 - (t \bar{S}_{sg})$, where *t* is the tabulated value of *t* with *n*-2 degrees of freedom and $\bar{S}_{sg}$ is the average error of sg_{ij} (Hagiwara et al., 2001).

The genetic diversity parameter: number of alleles per locus and heterozygosity (observed and expected) were estimated using the program POPGENE version 1.31 (Yeh et al., 1999).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 26 alleles were amplified with 14 SSR loci analyzed in 93 accessions. Of the 14 *primers*, 12 generated polymorphic (GA-5 GA-12 GA-16 GA-21 GA-57 GA-123, GA-127, GA-131, GA-134, GA-136, GA-140 and GA-161). The number of alleles observed per locus ranged from 2-4 with an average of 2.2 alleles per locus and the most informative primer GA-131 was amplified by having a larger number of alleles (Table 3).

Table 3 Number of alleles per locus (A), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e). UFLA, Lavras-MG, 2009

PRIMER	A	H_o	H_e
GA-5	2	0.52	0.49
GA-12	2	0.00	0.45
GA-16	2	0.20	0.34
GA-21	2	0.00	0.49
GA-57	2	0.00	0.42
GA-123	2	0.00	0.48
GA-127	2	0.00	0.49
GA-131	4	0.56	0.69
GA-134	2	0.00	0.49
GA-136	2	0.00	0.42
GA-140	2	0.31	0.45
GA-161	2	0.56	0.49
Average	2.2	0.18	0.46

In this study, the findings resemble those of Roa et al. (2000). These authors, working with the amplification of DNA from cassava by means of microsatellite markers, found a higher polymorphism with the same *primer* GA-131. Mühlen et al. (2000) studied the genetic variability of cassava landraces assessed by microsatellite markers; obtained 97.96% of polymorphic primers, with the total number 2-8 alleles per locus and an average of 4.5 alleles per loci.

Assessment of diversity using molecular markers has confirmed the wide genetic variability of cassava, but some comparisons with wild species indicate that they may contain as much or more variability than the cultivated. Wanyera et al. (1992) using polymorphism of 13 isozyme loci, analyzed the genetic variability of 20 plants of *M. glaziovii*, 20 cassava clones and 49 clones of cassava tree, collected in Nigeria, and found higher diversity among cassava tree, followed by *M. glaziovii* and less variability among the cassava clones.

Heterozygosity can be considered a measure of genetic variability. This measure refers to how much of that variation exists in the population and how that variation is distributed across the alleles of an analyzed locus. Low heterozygosity means little genetic variability. It is considered a polymorphic locus when the most common allele frequency is less than 0.95 (Menezes et al., 2006). The heterozygosity of a marker is the probability of an individual being heterozygous at a marker locus, and this depends on the number of alleles and their frequency in the population.

The observed heterozygosity (H_o) is the proportion of heterozygous individuals in population samples, expected heterozygosity (H_e) is the probability of an individual being heterozygous in any locus. In this study, the highest heterozygosity values observed and expected (Table 3) were achieved with primer GA-131 ($H_o=0.56$ and $H_e=0.69$). The observed heterozygosity showed low values in relation at expected heterozygosity values in most of the loci, indicating homozygous in excess. 58% of the polymorphic primers were homozygous and this suggests that sexual reproduction from the 93 clones must have had a high rate of self-pollination. Another possibility is that the clones originated from small populations or high levels of inbreeding.

The accessions showed values among 0.00 and 0.56 to observed heterozygosity and values among 0.34 and 0.69 to expected heterozygosity. The average achieved for these index were $H_o=0.18$ and $H_e=0.46$. Roa et al. (2000)

found for 10 microsatellite loci, levels of expected heterozygosity $H_e=0.43$ (38 accessions of *Manihot esculenta*), $H_e=0.31$ (26 accessions of *Manihot carthaginensis*), $H_e=0.54$ (16 accessions of *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia*) and $H_e=0.32$ (*Manihot esculenta* ssp. *peruviana*). The index of heterozygosity observed were $H_o=0.63$; $H_o=0.12$; $H_o=0.44$ and $H_o=0.31$ respectively. Lefèvre and Charrier (1993) found rates of heterozygosity for 17 polymorphic isozyme loci of 0.225 in 365 accessions of cassava and 0.252 in 109 accessions of *M. glaziovii*.

The dendrogram (Figure 1) in the cluster analysis indicates genetic variability among analyzed accessions and it was observed that the amplitude in the similarity coefficient of Dice ranged from 0.50 to 1.00. There was also the presence of four pairs of duplicates [(UFLA 65 (40)/UFLA 10 (75); UFLA 75 (55)/UFLA 17 (56); UFLA 61 (42)/UFLA 8 (45) and UFLA 24 (58)/BAIANINHA (59)]. The cassava germplasm is made up of varieties and natural hybrids found in places of origin, collections and in the production areas in several countries.

These genotypes are often given confusing names, sometimes assigning the same name to different access or different names to the same access, which complicates the correct identification of the material and may cause the presence of duplicates in germplasm banks. Thus based on this same rationale, it is noted in Table 1, different accessions of the same name (accessions 37 and 91 - MOCOTÓ and accessions 50 and 77 - UFLA 60). Those through the dendrogram are in different groups.

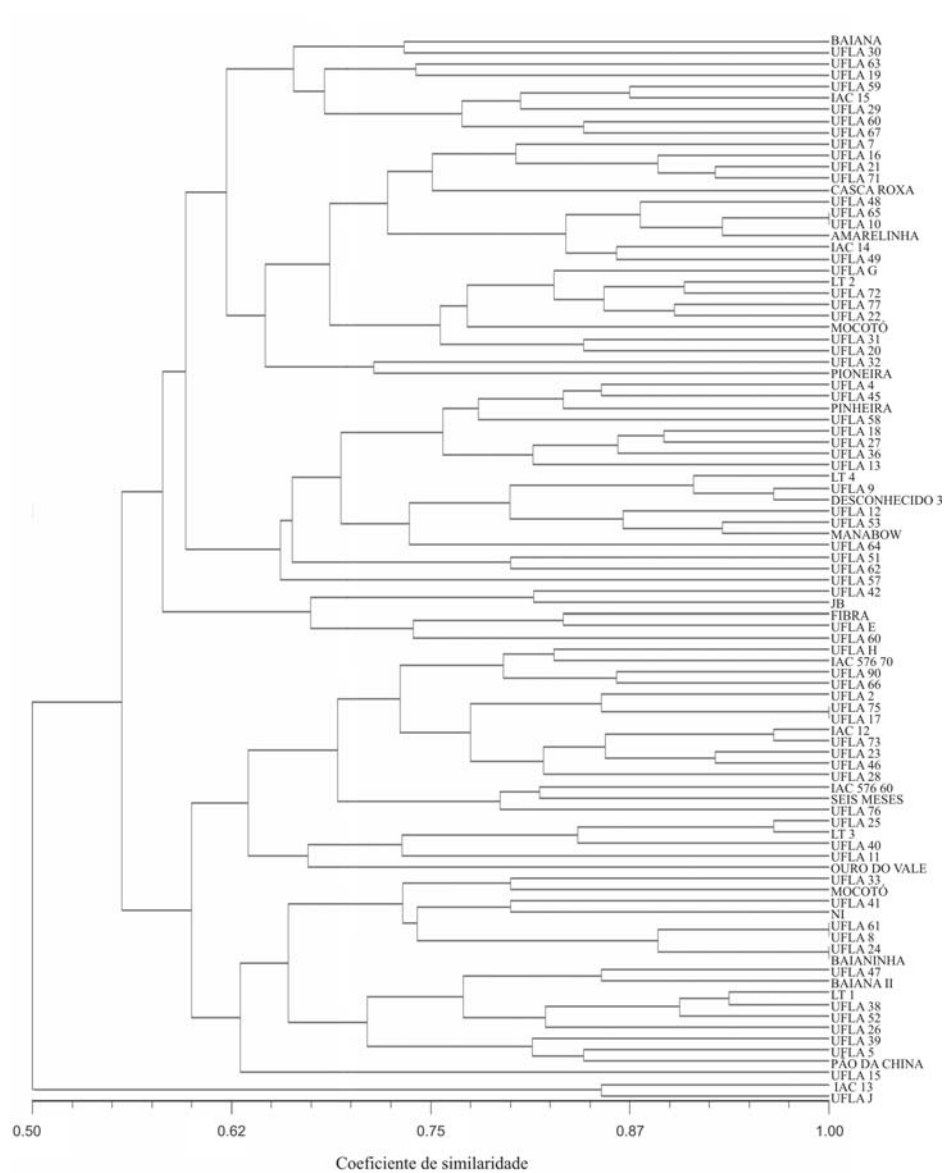


Figure 1 Dendrogram derived from Dice similarity coefficient using UPGMA for the 93 cassava accessions. UFLA, Lavras-MG, 2009

Coefficients of similarity between the 93 cassava accessions ranged from 0.16 to 0.96. The lowest genetic similarity (0.16) was observed among accessions UFLA 60 and UFLA 76, while the highest genetic similarity was observed between UFLA 9 and DESCONHECIDO 3; UFLA 25 and LT 3; IAC 12 and UFLA 73 all with 0, 96 similarity. After estimating the genetic similarities and considering the similarity of 69% among clones, we observed the formation of 20 groups.

The groups formed were: **Group I** (BAIANA and UFLA 30), **Group II** (UFLA 63 and UFLA 19), **Group III** (UFLA 59, IAC 15, UFLA 29, UFLA 60 and UFLA 67), **Group IV** (UFLA 7, UFLA 16, UFLA 21, UFLA 71, CASCA ROXA, UFLA 48, UFLA 65, UFLA 10, AMARELINHA, IAC 14 and UFLA 49), **Group V** (UFLA G, LT 2, UFLA 72, UFLA 77, UFLA 22, MOCOTÓ, UFLA 31 and UFLA 20), **Group VI** (UFLA 32 and PIONEIRA), **Group VII** (UFLA 4, UFLA 45, PINHEIRA, UFLA 58, UFLA 18, UFLA 27, UFLA 36 e UFLA 13), **Group VIII** (LT 4, UFLA 9, DESCONHECIDO 3, UFLA 12, UFLA 53, MANABOW and UFLA 64), **Group IX** (UFLA 51 and UFLA 62), **Group X** (UFLA 57), **Group XI** (UFLA 42 and JB), **Group XII** (FIBRA, UFLA E and UFLA 60), **Group XIII** (UFLA H, IAC 576 70, UFLA 90, UFLA 66, UFLA 2, UFLA 75, UFLA 17, IAC 12, UFLA 73, UFLA 23, UFLA 46 and UFLA 28), **Group XIV** (IAC 576 60, SEIS MESES and UFLA 76), **Group XV** (UFLA 25, LT 3, UFLA 40 and UFLA 11), **Group XVI** (OURO DO VALE), **Group XVII** (UFLA 33, MOCOTÓ, UFLA 41, NI, UFLA 61, UFLA 8, UFLA 24 and BAIANINHA), **Group XVIII** (UFLA 47, BAIANA II, LT 1, UFLA 38, UFLA 52, UFLA 26, UFLA 39, UFLA 5 and PÃO DA CHINA), **Group XIX** (UFLA 15), **Group XX** (IAC 13 and UFLA J).

Group XIII, composed of 12 accessions or 12.90% of the total was the largest. Followed by group IV with 11 (11.83%), group XVIII with 9 (9.68%); groups V, VII and XVII with eight accessions each (8.60%), group VIII 7

(7.53%), group III with five accessions (5.38%), group XV 4 (4.3%), groups XII and XIV with three (3.22%), groups I, II, VI, IX, XI and XX with 2 each (2.15%) and the groups X, XVI, XIX with only one access (1.08%). It was observed that the clustering method was effective in discriminating accesses as far as diversity, considering the large number of groups and the relatively low values of similarity between various approaches. However, there are very high values of sg_{ij} between some clones as seen at 0.96, which may mean access duplication. It is necessary to note the small number of bands and mainly the loci used. As similarity is an estimate of relatedness between the clones, based on a sample of the cassava genome, it was noticed that the sample was deficient. Consequently, the estimates may not be a true indicator of kinship. Therefore, more markers and morpho-agronomic characterization of clones should be considered for better definition of kinship, especially in the identification of duplicates to be eliminated from the germplasm.

The genotypes that showed high similarity (0.96) are UFLA 9/DESCONHECIDO 3, UFLA 25/LT 3 and IAC 12/UFLA 73. OURO DO VALE cultivar and new clones UFLA 57 and UFLA 15 are not grouped with any other material. The new clones UFLA 60 and UFLA 76 showed 16% similarity with these being the most divergent.

CONCLUSIONS

1. The use of microsatellite markers allows the determination of genetic divergence between cassava clones;
2. The microsatellite markers also identify possible duplicates in germplasm collections;
3. In this study, certain sequences of the *primers* were more suitable for the amplification of alleles.

REFERENCES

Carvalho LJCB. and SCHAAL BA (2001) Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica** **120**: 133-142.

Chavarriaga-Aguirre P, Maya MM, Bonierbale MW, Kresovich S, Fregene MA, Tohme J and Kochert G (1998) Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics** **97**: 493-501.

Colombo C, Second G and Charrier A (2000) Diversity within american cassava germoplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology** **23**: 189-199.

Costa MR, Cardoso ER and Ohaze MMM (2003) Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia** **27**: 158-164.

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology** **26**: 297-302.

Elias M, Mckey D, Panaud O, Anstett MC and Robert T (2001) Traditional management of cassava morphological and genetic diversity by the Makushi Amerindians (Guyana, South America): Perspectives for on-farm conservation of crop genetic resources. **Euphytica** **120**: 143-157.

Elias M, Mühlen GS, Mckey D, Roa AC and Tohme J (2004) Genetic diversity of traditional south american landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany** **58**: 242-256.

Faraldo MIF, Silva RM, Ando A and Veasey EA (2002) Marcadores moleculares em mandioca. In: Cereda MP (ed.) **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Fundação Cargill, São Paulo, p. 101-117.

Fukuda WMG, Costa IRS, Vilarinhos AD and Oliveira RP (1996) **Banco de Germoplasma de Mandioca: manejo, conservação e caracterização**. EMBRAPA, Cruz das Almas, 103p.

Fukuda WMG, Costa IRS and Silva SO (2005) **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. EMBRAPA, Cruz das Almas, 4p.

Fukuda WMG and Iglesias C (2006) Recursos Genéticos. In: Souza LS, Farias ARN, Mattos PLP and Fukuda WMG (eds.) **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. EMBRAPA, Cruz das Almas, p. 301-323.

Hagiwara WE, Santos JB and Carmo SLM (2001) Use of RAPD to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 1**: 335-362.

Lefèvre F and Charrier A (1993) Isozyme diversity within African *Manihot* germoplasm. **Euphytica 66**: 73-80.

Mba REC, Stephenson P, Edwards K, Melzer S, Nkumbira J, Gullberg U, Apel K, Gale M, Tohme J and Fregene M (2001) Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. **Theoretical and Applied Genetics 102**: 21-31.

Menezes MPC, Martinez AM, Ribeiro MN, Pimenta-Filho EC and Delgado JV (2006) Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia 35**: 1336-1341.

Mühlen GS, Martins PS and Ando A (2000) Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca avaliada por marcadores moleculares de DNA. **Scientia Agricola 57**: 319-328.

Pereira HS, Santos JB, Abreu AFB and Couto KR (2007) Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 42**: 707-713.

Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C and Tohme J (2000) Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany 87**: 1647-1655.

Rohlf FJ (2000) **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software: Setauket, Nova York, 83 p.

Wanyera NMW, Hahn SK and Aken'ova ME (1992) Introgression of ceara rubber (*Manihot glaziovii* Muell-Arg) into cassava (*M. esculenta* Crantz): a morphological and electrophoretic evidence. In: Akoroda MO (ed.) **Proceedings of Root crops for food security in Africa**. Africa Branch, Ibadan, NG, p. 125-130.

Yeh FC, Boyle T, Ye Z and Xiyang JM (1999) **POPGENE Version 1.31: Microsoft Window based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for international Forestry Research.

Zaccarias AM, Botha AM, Labuschagne MT and Benesi IRM (2004) Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm from Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica** **138**: 49-53.

**ANATOMIA FOLIAR DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA EM
FUNÇÃO DO POTENCIAL PARA TOLERÂNCIA A DIFERENTES
CONDIÇÕES AMBIENTAIS**

**Preparado de acordo com as normas da Revista Ciência Agronômica –
Versão preliminar**

Anatomia foliar de genótipos de mandioca em função do potencial para tolerância a diferentes condições ambientais

Resumo – A mandioca é uma importante planta cultivada em regiões tropicais, possuindo grande variabilidade genética ainda pouco estudada. Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a anatomia foliar de treze genótipos de mandioca, avaliando o seu potencial para adaptação em diferentes condições ambientais. Foram coletadas folhas completamente expandidas de treze genótipos de mandioca e analisados quanto às modificações quantitativas em microscopia óptica. Os genótipos apresentaram grande plasticidade anatômica, para a maioria dos tecidos foliares e as modificações ocorreram nas características estomáticas, como densidade e tamanho dos estômatos, na espessura dos tecidos como a epiderme da face abaxial, o parênquima paliçádico e esponjoso, no floema e no xilema. Os genótipos UFLA E, IAC 14 e UFLA J se caracterizam como potenciais para condições xéricas, em decorrência da alta densidade estomática, estômatos menores, maior epiderme da face adaxial, maior espessura do parênquima paliçádico e esponjoso, menor vulnerabilidade do xilema e maior espessura do floema, permitindo redução na transpiração e melhor aproveitamento de uma grande quantidade de radiação incidente. Os demais genótipos apresentam características mais mesófitas. Logo, os genótipos de mandioca possuem plasticidade anatômica e podem ser potenciais para a seleção de características desejáveis para diferentes condições ambientais.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*. Seca. Euphorbiaceae. Anatomia quantitativa.

Leaf anatomy of cassava genotypes in function of potential tolerance to different environmental conditions

Abstract – Cassava is an important crop for the tropics and has high genetic variability still poorly studied. The aim of this work was to examine the leaf anatomy of thirteen cassava genotypes, and assess their potential for adaptation in different environmental conditions. Full expanded leaves were collected from thirteen cassava genotypes and were analyzed in terms of quantitative changes under optical microscopy. The genotypes showed large anatomical plasticity for most of the leaf tissue, and the changes occurred in stomatal characteristics, such as density and stomatal size, thickness of tissues such as the abaxial epidermis, the palisade and spongy parenchyma, in phloem and xylem. Genotypes UFLA E, IAC 14 and UFLA J are characterized as a potential for xeric conditions due to high stomatal density, smaller stomata, greater on the adaxial epidermis, thicker palisade and spongy parenchyma, reduced vulnerability of xylem and increased phloem thickness, allowing for transpiration reduction and better utilization of a large amount of incoming radiation. The other genotypes have more mesophyte features. Thus, the cassava genotypes have anatomical plasticity and may be a potential selection because of desirable characteristics for different environmental conditions.

Key words: *Manihot esculenta*. Drought. Euphorbiaceae. Quantitative anatomy.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta tropical cultivada amplamente em várias regiões do mundo, pertence à família Euphorbiaceae, sendo cultivada em regiões com altas temperaturas e precipitação acima de 500 mm anuais, possui uma grande variabilidade genética ainda pouco explorada (CERQUEIRA, 1992).

O centro de origem da mandioca está localizado na América Latina, sendo encontrada na forma nativa em uma grande área que abrange países como Brasil, Peru, Venezuela, Guiana, Bolívia e Suriname, podendo ser encontrada, ainda, na forma selvagem, ocorrendo naturalmente nesses países, dificultando a indicação da região exata de origem (ALLEM, 1994). Em razão das regiões de origem das espécies de mandioca serem sujeitas a diferentes estresses, essas espécies podem exibir base genética para a tolerância à seca, altas temperaturas e mesmo a temperaturas mais amenas (NASSAR, 1979).

As folhas de mandioca foram descritas por Ueno e Agarie (1997) como hipoestomáticas, com parênquima paliádico e esponjoso definido, células da bainha do feixe desenvolvidas com cloroplastos distribuídos radialmente. As ceras cuticulares de mandioca são ricas em triterpenos e possuem alcanos e ácidos carboxílicos em menor quantidade, podendo variar entre os genótipos (ZINSOU et al., 2006). Apesar da ausência de estrutura Kranz típica, a fotossíntese na mandioca é considerada como C_4 por alguns autores (COCK et al., 1987) ou como C_3 por outros (UENO; AGARIE, 1997), ou mesmo como C_3 - C_4 intermediárias, devendo, ainda, ser realizados outros estudos.

A anatomia vegetal pode indicar características que atribuem tolerância a diferentes condições ambientais para as plantas cultivadas, como tolerância à seca (GRISI et al., 2008) e característica da radiação como a qualidade e intensidade da radiação que incide sobre as folhas das plantas, promovendo

modificações em sua estrutura para a tolerância a essas condições (SOUZA et al., 2007; SANTIAGO et al., 2001).

Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar a estrutura interna das folhas de diferentes genótipos de mandioca, analisando essas características quanto ao potencial para a tolerância a diferentes condições ambientais.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no campo experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA), de onde se coletaram folhas de 13 genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), escolhidos pelo potencial de produção evidenciado em avaliações anteriores (GOMES, 2007). As análises anatômicas foram conduzidas no Laboratório de Anatomia Vegetal da referida Universidade.

Coletaram-se as primeiras duas folhas, completamente expandidas em três plantas por genótipo, sendo as folhas fixadas em F.A.A.70 (Formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70% na proporção de 0,5: 0,5: 9,0) por 72 horas e, posteriormente, armazenadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Os genótipos selecionados foram: BAIANA, UFLA H, UFLA G, FIBRA, UFLA E, IAC 15, IAC 13, MOCOTÓ, IAC 12, IAC 14, BAIANINHA, UFLA J e OURO DO VALE, os quais foram cultivados em condições de campo com adubação e correção do solo, de acordo com as recomendações (ANDRADE; CORRÊA, 2005) e irrigação diária até a capacidade de campo, proporcionando condições semelhantes e ideais para todos os genótipos estudados.

Os cortes paradérmicos foram obtidos da região central dos dois folíolos basais de cada uma das folhas coletadas, utilizando-se lâmina de barbear e os cortes transversais da região mediana do folíolo central de cada uma das folhas utilizando-se um micrótomo de mesa modelo LPC. Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio 50% (comercial), lavados em água destilada por duas vezes, durante 10 minutos, corados com solução de safranina 1% para os cortes paradérmicos e solução safrablau (safranina e azul de astra na proporção de 7:3) para os cortes transversais, sendo, posteriormente, montados em lâmina e lamínula com água glicerizada (1:1), as lâminas foram seladas com resina de nitrocelulose.

As lâminas foram observadas e fotografadas em um microscópio óptico, modelo Olympus BX 60, acoplado à câmera digital Canon A630. As imagens foram analisadas em software, para análise de imagens UTHSCSA Imagetool, com a medição de cinco campos por repetição para cada variável analisada. Foram medidas: DP=diâmetro polar dos estômatos; DQ=diâmetro equatorial dos estômatos; EAD=espessura da epiderme da face adaxial; EAB=espessura da epiderme da face abaxial; PP=espessura do parênquima paliçádico; PE=espessura do parênquima esponjoso; CT=espessura da cutícula; FL=espessura do floema. Foram calculados a densidade estomática (DE), índice estomático (IE), segundo Castro et al. (2009) e o índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC) para o xilema segundo Carlquist (1975) e Castro et al. (2009).

O delineamento foi inteiramente casualizado com 15 repetições e 13 tratamentos. Foram realizadas análises de variância e teste de Scott-Knott (1974) a 5% de significância, utilizando-se o software de análise estatística Sisvar (FERREIRA, 2000).

Resultados e Discussão

Com os genótipos demonstraram-se diferentes características para as secções paradérmicas. O diâmetro polar exibiu grande variação, evidenciando que as folhas de mandioca possuem plasticidade para essa característica (Tabela 1). O genótipo IAC 15 é 33,54% superior ao genótipo UFLA G, que exibiu o menor diâmetro. O valor do diâmetro polar, para o genótipo IAC 15, é 6,37% superior aos genótipos IAC 12 e IAC 14 e 12,50% superior aos genótipos BAIANA, UFLA E, BAIANINHA e UFLA J. É, ainda, superior aos genótipos UFLA H, FIBRA, IAC 13, MOCOTÓ e OURO DO VALE com valores 24,89% inferiores.

Tabela 1 Características das secções paradérmicas da epiderme foliar dos 13 genótipos de mandioca. UFLA, Lavras-MG, 2009

GENÓTIPOS	DP(µm)	DQ(µm)	FUN	DE	IE (%)
BAIANA	43,61 c	27,94 a	1,56 d	100,22 d	09,64 b
UFLA H	39,09 d	23,54 b	1,67 c	101,40 d	08,03 c
UFLA G	35,99 e	23,76 b	1,52 d	182,76 a	12,29 a
FIBRA	38,48 d	22,11 b	1,75 c	132,06 c	10,27 b
UFLA E	42,82 c	20,40 b	2,12 a	146,21 b	11,93 a
IAC 15	48,06 a	28,20 a	1,71 c	117,91 d	10,44 b
IAC 13	40,56 d	23,38 b	1,75 c	113,19 d	09,37 b
MOCOTÓ	41,36 d	27,30 a	1,52 d	146,21 b	11,55 a
IAC 12	45,18 b	25,35 a	1,78 c	106,12 d	08,38 c
IAC 14	45,33 b	24,26 b	1,87 b	102,58 d	09,04 c
BAIANINHA	43,90 c	26,11 a	1,69 c	149,75 b	12,83 a
UFLA J	42,72 c	23,03 b	1,86 b	134,42 c	11,29 a
OURO DO VALE	40,55 d	23,10 b	1,75 c	176,87 a	10,53 b
CV (%)	5,05	7,51	7,45	8,74	8,35

DP=diâmetro polar dos estômatos; DQ=diâmetro equatorial dos estômatos; DE=densidade estomática (estômatos por mm²); FUN=funcionalidade estomática; IE=índice estomático. Médias seguidas da mesma letra pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott (1974) para P<0,05

O diâmetro polar está diretamente relacionado com o tamanho dos estômatos (CASTRO et al., 2009) cujas características ambientais são diretamente relacionadas com o diâmetro polar, que pode diminuir em resposta à deficiência hídrica (GRISI et al., 2008). Dessa forma, os estômatos do genótipo IAC 15 são maiores que os dos demais genótipos, e estômatos maiores podem ser associados com uma baixa densidade estomática (Tabela 1), que indica melhor adaptação desse genótipo a condições de alta disponibilidade de água e menor radiação (BOEGER; WISNIEWSKI, 2003).

A redução da transpiração pode ser associada a uma alta funcionalidade estomática, pois, os estômatos se tornam mais elípticos (CASTRO et al., 2009), a redução da transpiração pode, ainda, ser associada à alta densidade estomática que, frequentemente, é observada em condições de maior quantidade de radiação e de menor disponibilidade de água (CASTRO et al., 2009; SANTIAGO et al., 2001; BOEGER; WISNIEWSKI, 2003; SOUZA et al., 2007).

Entre os genótipos com maiores valores para funcionalidade e densidade estomática, portanto, destacam-se UFLA E, IAC 14 e UFLA J. A maior média observada no genótipo UFLA E (Tabela 1) é 28,30% superior aos genótipos BAIANA, UFLA G e MOCOTÓ, que apresentaram menores médias para funcionalidade estomática, demonstrando que esse genótipo apresenta estômatos mais funcionais associados à alta densidade estomática, sendo 45,89% superior aos genótipos BAIANA, UFLA H, IAC 15, IAC 13 e BAIANINHA. Constituem, claramente, um grupo que se adapta a condições de maior disponibilidade de água. O genótipo UFLA E pode ser reconhecido como o que possui características xerofíticas para os estômatos e o mais adaptado a condições de baixa disponibilidade de água.

As características xeromorfas da mandioca podem ter, em parte, uma base genética em decorrência da origem dessa espécie em regiões quentes e secas (ALLEM, 1994). Maiores densidade e funcionalidade conferem ao

genótipo UFLA E alta adaptabilidade a ambientes xéricos. Essas características estão frequentemente, associadas a esse tipo de ambiente (CASTRO et al., 2009; GRISI et al., 2008). Segundo Cerqueira (1992), essa espécie demonstrou plasticidade na densidade estomática em condições de deficiência hídrica e o nível de plasticidade foi diferente para as cultivares estudadas.

Portanto, alta densidade permite a abertura estomática em menor espaço de tempo, ao permitir uma captação adequada de CO₂ e ao reduzir o tempo de abertura dos estômatos. Consequentemente reduz a transpiração, permitindo, assim, uma melhor adaptação do genótipo UFLA E a condições de pouca disponibilidade de água.

Nessas condições, os genótipos com características mais mesofíticas (BAIANA, UFLA H, UFLA G, FIBRA, IAC 15, IAC 13, MOCOTÓ, IAC 12, BAIANINHA e OURO DO VALE) não são recomendados para condições xéricas, com especial referência para os genótipos UFLA G e OURO DO VALE, que possuem alta densidade e estômatos pouco funcionais (Tabela 1) e podem causar uma excessiva transpiração para esses genótipos, dificultando suas adaptações a essas condições.

O índice estomático é o investimento da planta na produção de estômatos, em relação ao total de células epidérmicas e está diretamente relacionado à densidade estomática (Tabela 1). Segundo Cutter (1986), o índice estomático é, razoavelmente constante, para uma dada espécie, sendo afetado em grande parte somente pela umidade. Os genótipos que apresentaram os maiores valores para índice estomático (UFLA G, UFLA E, MOCOTÓ, BAIANINHA e UFLA J) são mais adaptados a ambientes com pouca disponibilidade de água e alta radiação solar, dando destaque aos genótipos UFLA E e UFLA J que, em análises anteriores, já apresentavam características a condições xéricas.

Os estômatos em secção paradérmica são classificados como paracíticos em todos os genótipos estudados e estão localizados em depressões da epiderme,

características de plantas xeromorfas (CASTRO et al., 2009; ESAU, 1974). A presença dos estômatos em depressões é, acentuadamente, mais evidente nos genótipos UFLA E, IAC 14 e UFLA J. Esse fato corrobora a maior xeromorfia das folhas do genótipo UFLA E em especial.

Essa característica é interessante, pois, pode reduzir a transpiração nesses genótipos, por reduzir a incidência de ventos, que podem ser diretamente relacionados com a transpiração e por remover o vapor de água da camada limítrofe nas folhas, aumentando o déficit de pressão de vapor, promovendo um aumento na transpiração (CASTRO et al., 2009; STRECK, 2003). Dessa forma, o genótipo UFLA E se destaca com características estomáticas para reduzir a transpiração, sendo o genótipo mais indicado para a utilização nessas condições, destacando-se, ainda, os genótipos IAC 14 e UFLA J.

O genótipo UFLA E se destaca, também, com adaptações para reduzir a perda de água, com a epiderme adaxial 37,18% superior em espessura, em relação ao grupo formado pelos genótipos com características mesófitas (Tabela 2). Esse padrão se repete nos genótipos IAC 14 e UFLA J, que exibiram características xerofíticas em secção paradérmica (Tabelas 1 e 2). A espessura da epiderme adaxial pode estar relacionada com as condições de intensidade de radiação ou das condições hídricas (SOUZA et al., 2007; CASTRO et al., 2009), atenuando a radiação incidente e a redução da taxa transpiratória. Assim, os genótipos UFLA E, IAC 14 e UFLA J, em associação com as características estomáticas (Tabela 1), podem ser mais tolerantes às condições de seca e à alta intensidade luminosa.

Tabela 2 Características dos tecidos foliares dos 13 genótipos de mandioca em secção transversal. UFLA, Lavras-MG, 2009

GENÓTIPOS	EAD	EAB	PP	PE	CT	IVC	FL
BAIANA	14,35 b	17,72 a	119,22 b	73,88 a	5,09 a	0,51 d	122,03 a
UFLA H	12,49 b	18,02 a	090,35 c	70,52 a	5,96 a	0,86 b	113,14 a
UFLA G	13,30 b	17,08 a	086,02 c	52,78 b	6,16 a	1,06 a	092,99 b
FIBRA	18,26 a	18,02 a	092,82 c	73,62 a	5,96 a	1,07 a	102,91 b
UFLA E	16,27 a	16,40 a	112,96 b	66,40 a	5,76 a	0,83 b	120,21 a
IAC 15	14,17 b	15,19 a	113,78 b	66,78 a	5,38 a	0,62 d	116,88 a
IAC 13	14,99 a	16,27 a	106,41 b	64,40 a	5,46 a	0,64 d	121,68 a
MOCOTÓ	14,32 b	16,51 a	116,01 b	70,65 a	5,87 a	0,75 c	107,92 b
IAC 12	15,93 a	15,60 a	139,86 a	76,72 a	6,38 a	0,83 b	114,80 a
IAC 14	15,39 a	16,70 a	120,72 b	70,08 a	5,89 a	0,77 c	103,00 b
BAIANINHA	11,86 b	18,03 a	091,55 c	54,42 b	5,71 a	1,03 a	116,64 a
UFLA J	14,95 a	17,88 a	116,26 b	81,58 a	6,74 a	0,85 b	112,11 a
OURO DO VALE	13,39 b	16,10 a	094,80 c	64,72 a	5,97 a	0,85 b	107,67 b
CV (%)	13,65	13,07	9,74	13,31	17,71	13,24	10,24

EAD=espessura da epiderme da face adaxial, EAB=espessura da epiderme da face abaxial, PP=espessura do parênquima paliçádico, PE=espessura do parênquima esponjoso, CT=espessura da cutícula, IVC=índice de vulnerabilidade de Carlquist, FL=espessura do floema. Médias seguidas da mesma letra pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott (1974) para $P < 0,05$

A epiderme abaxial pode ser menos responsiva às variações ambientais, em relação à epiderme adaxial, em virtude da radiação ser diretamente incidente sobre a epiderme adaxial (CASTRO et al., 2009) e a transpiração ocorrer, principalmente, pela epiderme adaxial (STRECK, 2003). A epiderme abaxial pode não se modificar em diferentes condições hídricas (GRISI et al., 2008). Logo, como as plantas dos diferentes genótipos estavam em condições semelhantes, não ocorreram diferenças na epiderme abaxial (Tabela 2), demonstrando que, para esses genótipos, a epiderme adaxial pode ser mais responsiva e relacionada com a aclimatização em condições de déficit hídrico.

O genótipo IAC 12 obteve a maior média para o parênquima paliçádico, sendo 86,06% superior aos genótipos de menor valor para esta variável (UFLA H, UFLA G, FIBRA, BAIANINHA e OURO DO VALE). Os genótipos BAIANA, UFLA E, IAC 15, IAC 13, MOCOTÓ, IAC 14 e UFLA J foram 40,34% maiores aos genótipos com menores espessuras de parênquima paliçádico (Tabela 2). Esses valores são associados aos de parênquima esponjoso, que exibiu dois grupos, os quais possuem menores valores, formados pelos genótipos UFLA G e BAIANINHA com valores 54,56% menores aos dos demais genótipos (Tabela 2).

Diferentes genótipos de café responderam de forma diferente ao estresse hídrico, quanto às espessuras do parênquima paliçádico e parênquima esponjoso (GRISI et al., 2008). A parênquima paliçádico está diretamente relacionada com a utilização da radiação na fotossíntese (CASTRO et al., 2009; ESAU, 1974) e o parênquima esponjoso está diretamente relacionado com a fotossíntese pela captação de CO₂ (CASTRO et al., 2009; ESAU, 1974). Assim, os maiores valores para parênquima paliçádico e parênquima esponjoso podem conferir maior capacidade fotossintética aos genótipos que as exibem, sendo um fator favorável em condições de alta radiação incidente.

Em condições de alta radiação, ocorre maior espessura das folhas, que está relacionada com o índice de esclerofilia (BOEGER; WISNIEWSKI, 2003) e com folhas de sol (CASTRO et al., 2009; ESAU, 1974). O aumento da espessura foliar pode causar maior capacidade fotossintética dessas folhas por promover maior quantidade de espaços intercelulares e espaço para alocação dos cloroplastos, aumentando a fotossíntese potencial (OGUCHI et al., 2003). A plasticidade das folhas de mandioca, para aumentar o espaço interno de difusão de CO₂, foi relatado por El-Sharkawy et al. (1989).

Os maiores valores, portanto, para os parênquimas paliádico e esponjoso podem ser relacionados, diretamente, com a fotossíntese e com a esclerofilia das folhas, que podem ser adaptadas a maiores condições de radiação e de deficiência hídrica, dando destaque para os genótipos UFLA E, IAC 14 e UFLA J que, associados com as características estomáticas, podem ser mais eficientes para reduzir a transpiração e para aproveitar a radiação incidente.

A espessura da cutícula está diretamente relacionada com a redução da transpiração excessiva (CASTRO et al., 2009), contudo, os genótipos estudados estavam nas mesmas condições, não ocorrendo diferenças endógenas, mas, possivelmente, variáveis em condições de estresse. Pouca variação na cutícula foi observada, também, por Zinsou et al. (2006) quanto à infecção por patógenos.

O índice de vulnerabilidade de Carlquist está, diretamente, relacionado com uma maior eficiência do sistema vascular das plantas, podendo ser utilizado, para inferir sobre a probabilidade de embolias no xilema, sendo diretamente relacionado com o número e diâmetro dos vasos. Quanto menor a razão entre o diâmetro de vasos e o seu número por mm², maior é a xeromorfia e menor é a vulnerabilidade do sistema hidráulico. (CASTRO et al., 2009; CARLQUIST, 1975; HACKE; SPERRY, 2001).

O índice de vulnerabilidade de Carlquist pode variar, de acordo com as condições ambientais, como a seca e o alagamento, e a sua redução está relacionada com melhores condições do xilema para a condutividade hidráulica (CASTRO et al., 2009; PEREIRA et al., 2008). Os genótipos que demonstraram algumas características xerófitas (UFLA E, IAC 14 e UFLA J) apresentaram baixos valores para esta variável que os genótipos com maiores médias (UFLA G, FIBRA e BAIANINHA). Os valores para o grupo xerofítico foram 22,64% menores (UFLA E e UFLA J) e 29,24% (IAC 14) que as maiores médias (Tabela 2).

Esses dados corroboram uma melhor condição dos genótipos UFLA E, IAC 14 e UFLA J para ambientes xerofíticos que, frequentemente, podem levar à embolia no xilema (HACKE; SPERRY, 2001) e, associados com as demais características, permitem a esses genótipos uma melhor adaptabilidade a essas condições. Contudo, os genótipos com os maiores valores para o índice de vulnerabilidade de Carlquist podem demonstrar uma tendência para melhor adaptação em ambientes com grande disponibilidade de água, pois, dessa forma, o risco de embolias ou problemas de condutividade hidráulica pode ser reduzido.

O floema foi diferente para os genótipos (Tabela 2), formando dois grupos, os com valores 31,23% maiores que os menores valores. O floema está diretamente relacionado com a translocação de fotosintatos das folhas para os órgãos dreno (ESAU, 1974; CASTRO et al., 2009). Os genótipos com os maiores valores para essa característica demonstram maior potencial para translocação de fotoassimilados, podendo promover um maior desenvolvimento das raízes, produto de principal interesse para a espécie. Destacam-se, nesse aspecto, os genótipos UFLA E e UFLA J para os ambientes xerofíticos, e os genótipos BAIANA, UFLA H, IAC 15, IAC 13, IAC 12 e BAIANINHA, para os ambientes mesofíticos (Tabela 2), confirmando o potencial genético para a aclimatização em diferentes condições como observado por NASSAR (1979).

As folhas de todos os genótipos exibem estrutura dorsiventral em secção transversal (Figura 1). As diferenças de espessura das folhas são evidentes entre os genótipos, contudo, a estrutura básica se mantém em todos os genótipos. A cutícula está mais evidente na face adaxial, seguida de uma epiderme unisseriada na face adaxial, parênquima paliçádico, formado por uma camada de células com poucos espaços intercelulares, parênquima esponjoso, formado por cinco camadas de células, aproximadamente isodiamétricas, com espaços intercelulares abundantes. A epiderme da face abaxial é formada por uma camada de células mais espessas que a da face adaxial, com papilas evidentes e a presença de estômatos localizados em depressões formadas por desníveis na epiderme (Figura 1). Essa descrição e padrão da estrutura foliar, para os genótipos, estão de acordo com a descrita para a espécie por Ueno e Agarie (1997).

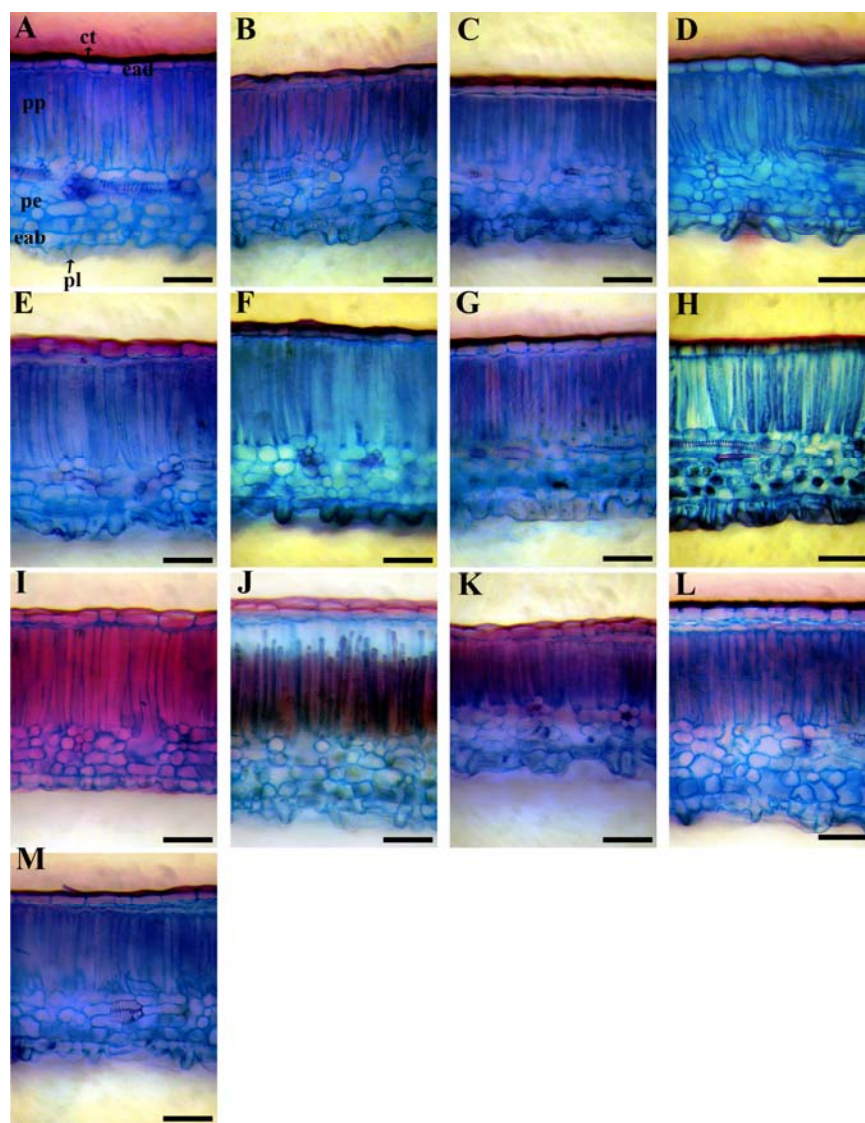


Figura 1 Secções transversais das folhas de mandioca (*Manihot esculenta*). ct=cutícula, ead=epiderme da face adaxial, eab=epiderme da face abaxial, pp=parênquima paliçádico, pe=parênquima esponjoso, pl=papila. A=BAIANA, B=UFLA H, C=UFLA G, D=FIBRA, E=UFLA E, F=IAC 15, G=IAC 13, H=MOCOTÓ, I=IAC 12, J=IAC 14, K=BAIANINHA, L=UFLA J, M=OURO DO VALE. Barras=50 μ m.

Conclusões

1. A estrutura interna dos 13 genótipos de mandioca (*Manihot esculenta*) estudados exibe diferenças que podem se relacionar com a adaptabilidade desses genótipos aos diferentes ambientes.
2. Os genótipos UFLA E, IAC 14 e UFLA J apresentam características mais xerofíticas, em relação aos demais genótipos e são, potencialmente, mais adequadas a ambientes com pouca água e muita radiação.
3. Os genótipos BAIANA, UFLA H, UFLA G, FIBRA, IAC 15, IAC 13, MOCOTÓ, IAC 12, BAIANINHA e OURO DO VALE apresentam características mais mesofíticas e, potencialmente, mais adequados para regiões de boa disponibilidade de água e baixa radiação.
4. Os genótipos não diferem, com relação ao tipo e disposição dos tecidos, no limbo foliar.

Referências

- ALLEM, A. C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genetics Resources and Crop Evolution**, v. 41, n. 3, p. 133-150, 1994.
- ANDRADE, L. A. B.; CORRÊA, J. B. D. Cultura da mandioca. Lavras/MG: Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2005, 27p. (**Texto Acadêmico**).
- BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.
- CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California Press, 1975.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estrutura e função dos órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009, 234p.
- CERQUEIRA, Y. M. Efeito da deficiência de água na anatomia foliar de cultivares de mandioca *Manihot esculenta* Crantz. I- densidade estomática. **Sitientibus**, n. 10, p. 103-115, 1992.
- COCK, J. H.; RIAÑO, N. M.; EL-SHARKAWY, M. A.; LÓPEZ, Y. F.; BASTIDAS, G. C₃-C₄ intermediate photosynthetic characteristics of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) – II. Initial products of ¹⁴CO₂ fixation. **Photosynthesis Research**, v. 12, n. 3, p. 237-241, 1987.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: parte I: células e tecidos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1986. 304 p.
- 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, n. 2, p. 143-154, 1989.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Edgard Blücher, São Paulo, 1974, 293 p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GOMES, C. N. **Caracterização morfo-agronômica e diversidade genética em mandioca *Manihot esculenta* Crantz.** A. 2007. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GRISI, F. A.; ALVES, J. D.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; BIAGIOTTI, G.; MELO, L. A. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café ‘Catuai’ e ‘Sirriema’ submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, 2008.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique.** New York: McGraw-Hill Book, 1940, 523p.

HACKE, U. G., SPERRY, J. S. Functional and ecological xylem anatomy. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Sistematics**, v. 4, n. 2, p. 97-115, 2001.

NASSAR, N. M. A. Three brazilian *Manihot* species with tolerance to stress condicions. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 59, p. 553-555, 1979.

OGUCHI, R.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T. Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy?. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, n. 4, p. 505-512, 2003.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p.1649-1656, 2008.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.

SANTIAGO, E. J. A.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M.; LAMEIRA, O. A.; CONCEIÇÃO, H. O. E.; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 5, p. 1035-1042, 2001.

SOUZA, G. S.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P. ALVES, J. E.; BIAGIOTTI, G.; DEUNER, S. Estrutura foliar e de cloroplastídeos em *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker em diferentes condições de qualidade de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5. supl. 1, p. 78-80, 2007.

STRECK, N. A. Stomatal response to water vapor pressure deficit: an unsolved issue. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 317-322, 2003.

UENO, O.; AGARIE, S. The intercellular distribution of glycine decarboxylase in leaves of cassava in relation to photosynthetic mode and leaf anatomy. **Japanese Journal of Crop Science**, v. 66, n. 2, p. 268-278, 1997.

ZINSOU, V.; WYDRA, K.; AHOHUENDO, B.; SCHREIBER, L. Leaf waxes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in relation to ecozone and resistance to *Xanthomonas* Blight. **Euphytica**, v. 149, n. 1/2, p. 189-198, 2006.