

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
CURSO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS NATURAIS DO GÊNERO *MANIHOT* A
PARTIR DE TÉCNICAS DE ANATOMIA FOLIAR, BIOLOGIA MOLECULAR E
CITOGENÉTICA**

ARIANA SILVA SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
ABRIL DE 2016**

**IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS NATURAIS DO GÊNERO *MANIHOT A*
PARTIR DE TÉCNICAS DE ANATOMIA FOLIAR, BIOLOGIA MOLECULAR E
CITOGENÉTICA**

ARIANA SILVA SANTOS

LICENCIADA EM BIOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA, 2013

Dissertação submetida ao colegiado de Curso do Programa Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e da Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Co-Orientadores: Prof. Dr. Márcio Lacerda Lopes Martins

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS – BAHIA – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Ariana Silva.

Identificação de híbridos naturais do gênero manihot a partir de técnicas de anatomia foliar, biologia molecular e citogenética / Ariana Silva Santos. – Cruz das Almas, BA, 2016.

88 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo.

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Lacerda Lopes Martins.

Coorientador: Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho.

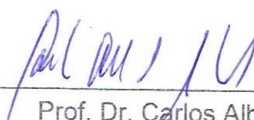
Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)-
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.

1. Mandioca. 2. Hibridação. 3. Melhoramento vegetal. 4. Método de melhoramento. I. Ledo, Carlos Alberto da Silva. II. Martins, Márcio Lacerda Lopes. III. Carvalho, Reginaldo de. IV. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia V. Título.

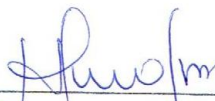
CDD: 633.682 (21.ed.)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA
ARIANA SILVA SANTOS



Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Orientador



Prof. Dr. Weliton Antonio de Bastos de Almeida
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas



Prof.ª Dr.ª Patrícia Luz Ribeiro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em
Recursos Genéticos Vegetais em
Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em
.....

“Não fui Eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

Ao meu porto seguro, Lucidalva e Edimário, meus pais
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu refúgio, ter me sustentado, fortalecido e guiado nesta trajetória.

As dificuldades enfrentadas no caminho, por me fazer um ser humano e profissional cada dia melhor.

Aos meus pais por terem acreditado em meu sonho, incentivando - me nos momentos mais desmotivadores; Aos meus irmãos e sobrinhos por toda compreensão e carinho.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, a Embrapa Mandioca e Fruticultura e aos professores da pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Ao convênio firmado entre a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudo.

Ao meu orientador Carlos Alberto da Silva Ledo pela oportunidade, serenidade, paciência e disponibilidade, primando sempre à construção do conhecimento. Por ter acreditado, confiado e investido no meu potencial durante nove anos de pesquisas juntos. A você serei eternamente grata.

Aos meus co-orientadores Márcio Lacerda e Reginaldo de Carvalho por todo apoio, paciência, disponibilidade, incentivos. Por partilhar conhecimentos e experiência de vida contribuindo para o sucesso deste trabalho e para minha vida profissional.

A Cláudia Fortes e Fabiano Martins, grandes colaboradores deste trabalho. Agradeço pelos incentivos, paciência, disponibilidade, orientação, carinho, por ter compartilhado conhecimento e contribuído de forma imensurável para esta

pesquisa e para minha vida profissional. Serei eternamente grata a vocês! Grata por cada momento de bancada juntos! Grata por cada momento de orientação! Grata por terem aceitado fazer parte desta equipe.

Ao professor Paulo César por toda disponibilidade nos momentos de coleta, estando sempre junto à equipe, levando sorrisos com suas histórias.

Ao Parque Municipal Sempre Viva e toda sua equipe, em especial ao guia Edmundo e ao Coordenador Gel por sempre nos receberem bem e ter aberto as portas para a execução deste trabalho.

A grande equipe do Laboratório de Biologia Molecular em especial Andresa, Vanderson e Raimundo. Agradeço a vocês meus amigos por estarem sempre do meu lado desde solucionando uma simples reação a me aconselhar, incentivar, me fazer sorrir e acreditar que no final tudo daria certo.

Aos meus amigos do LBM por todo carinho, pelos risos, pelos cafezinhos, pelos duradouros papos sobre moda, cabelo, famoso e claro, artigos científicos, em especial: Kátia, Claudinha, Luzi, Dalma, Joci, Iane, Zalmar, Zanon, Layana, Gil, Karla, Camila, Selminha, Tamyres, Lú, Eliana, Cátia (mamãe), Paulinho, Paulo (PH) Carol e Juli.

A Kátia Pestana por ter me orientado durante todo esse tempo nas bancadas do LBM, por sempre me incentivar, puxar minha orelha, estando sempre junto na execução deste trabalho, por compartilhar conhecimento contribuindo para minha formação, a você serei sempre grata.

A equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal em especial: Israel, Mara e Shirley por todo companheirismo, carinho, amizade, risos, experiências e conhecimentos compartilhados nesta trajetória. Por estarem sempre aptos a ajudar e contribuir. A Dona Neide por todos os momentos de distração e puxões de orelha.

A equipe do Laboratório de Citogenética Vegetal da UFRPE por terem me recebido de forma tão carinhosa, sempre me incentivando e dizendo: “Calma

baiana no final vai da tudo certo! Sabe aquela primeira foto?! Esta vai ser a escolhida.” Angel, Gênio, Vanessa (Dôdja), Vivi, Horaci, Lamonier, David, Carla, Rayane, Ravanny, a vocês muito obrigada por tudo! Por todo carinho, conhecimento, sorrisos, cafezinhos compartilhados.

A Angélica e Genialdo, por terem me orientado desde a bancada do LCV até as correções, dedicando seu tempo, carinho, paciência, amizade e conhecimento durante toda esta trajetória. Serei eternamente grata a vocês.

A minha família recifense, por me acolherem com tanto carinho e amor, D. Leleca, Raquel, Rebeca e Angel, gratidão é pouco à vocês.

Minhas grandes amigas, Fabi, Camila e Letícia (Mestrado Privilege). O que seria de mim sem vocês?!. Momentos de realizações, incentivos, carinho, farras, sorrisos, choros, momentos ímpares vividos e que serão sempre vividos, pois nossos laços são para sempre.

Aos melhores momentos vividos com o grupo “Chora Rita”, aos grandes amigos dele formado, em especial Zanon, Lucas, Mineiro, PH, Juli, Alice e Alírio.

A Cátia Dias, Verônica, Thamyres e Leandro por estarem sempre dispostos a me ajudar em momentos desesperadores.

A equipe “Mand. Silvestres” por juntos enfrentarmos o grande desafio de trabalhar com este gênero, em especial Dreid e Emília.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Página

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	13
Centro de origem e diversidade.....	14
Classificação do gênero – Taxonomia.....	15
Hibridação no gênero <i>Manihot</i>	16
Características e análises moleculares do gênero <i>Manihot</i>	17
Características e análises citogenéticas do gênero <i>Manihot</i>	19
Características e análises anatômicas do gênero <i>Manihot</i>	20
Espécies: Foco do presente estudo.....	20
Referências.....	25
CAPÍTULO I	
ANATOMIA VEGETAL COMO SUBSÍDIO PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS NATURAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>MANIHOT</i>	34
CAPÍTULO II	
BIOLOGIA MOLECULAR E CITOGENÉTICA COMO FERRAMENTAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDO NATURAL ENTRE <i>M. reniformis</i> Pohl e <i>M.</i> <i>reflexifolia</i> P. Carvalho & M. Martins.....	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS NATURAIS DO GÊNERO *MANIHOT* A PARTIR DE TÉCNICAS DE ANATOMIA FOLIAR, BIOLOGIA MOLECULAR E CITOGENÉTICA

Autora: Ariana Silva Santos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Co-Orientadores: Prof. Dr. Márcio Lacerda Lopes Martins

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

Resumo: Os objetivos deste trabalho foram caracterizar e identificar possíveis híbridos naturais do gênero *Manihot* junto aos seus progenitores *M. reflexifolia* e *M. reniformis*, a partir de técnicas da biologia molecular, citogenética e anatomia vegetal. Todos os materiais vegetais utilizados foram coletados no ambiente natural desses indivíduos, localizado no Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM), Projeto Sempre Viva, localizado na cidade de Mucugê, Bahia. Cortes histológicos das folhas foram feitos nos supostos híbridos e nos seus progenitores, a fim de caracterizar e detectar as estruturas anatômicas, subsidiando na identificação dos híbridos. Extração e amplificação do DNA de 50 indivíduos foram realizadas, sendo 21 indivíduos de *M. reflexifolia*; 14 de *M. reniformis* e 15 dos supostos híbridos. Foram utilizados 23 iniciadores microssatélites nas reações via PCR. Raízes adventícias foram coletadas para a realização da GISH, botões florais para o teste de viabilidade polínica dos supostos híbridos e dos parentais. A anatomia foliar mostrou-se uma excelente ferramenta para caracterizar *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e os híbridos e identificar os dois primeiros táxons silvestres como parentais dos híbridos (*M. reflexifolia* X *M. reniformis*) a partir dos caracteres anatômicos. O uso de técnicas da biologia molecular e da citogenética foram eficientes na identificação dos híbridos, contribuindo, sobretudo, para estudos posteriores sobre o gênero *Manihot*, podendo identificar novas potencialidades dos híbridos e dos seus progenitores.

Palavras-chave: cortes histológicos, GISH; hibridação natural; marcadores microssatélites.

IDENTIFICATION OF NATURAL HYBRIDS OF THE *Manihot* GENUS USING LEAF ANATOMY, MOLECULAR BIOLOGY AND CITOGENETICS

Author: Ariana Silva Santos

Advisor: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Co-advisors: Prof. Dr. Márcio Lacerda Lopes Martins

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

Abstract: The objective of the present work was to characterize and identify possible natural hybrids from the *Manihot* genus and its progenitors, *M. reflexifolia* and *M. reniformis*, using molecular biology and cytogenetic techniques as well as plant anatomy. All plant material was collected in the natural environment of the genotypes, at the Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM), Projeto Sempre Viva, located in the city of Mucugê, Bahia. Histological cuttings of the leaves were carried out for the possible hybrids and parents in order to characterize and detect anatomical structures to aid in the identification of the hybrids. DNA extraction and amplification of 50 genotypes was carried out for 21 *M. reflexifolia*; 14 *M. reniformis* and 15 possible hybrids. 23 microsatellite primers were used in PCR. Adventitious roots were collected for GISH and flower buds for pollen grain viability test of the possible hybrids and parents. Leaf anatomy was an excellent tool to characterize *M. reflexifolia*, *M. reniformis* and the hybrids and also to identify the first two wild taxons as progenitors of the hybrids (*M. reflexifolia* X *M. reniformis*) using the anatomical characteristics. Molecular biology and cytogenetic techniques were efficient in the identification of the hybrids, contributing to future studies regarding the *Manihot* genus, being able to identify new potential of the hybrids and their progenitors.

Key-words: histological cuttings, GISH; natural hybridization, microsatellite markers.

INTRODUÇÃO

Centro de origem e diversidade

O gênero *Manihot* distribui-se na Região Neotropical em dois grupos geograficamente isolados, na América Central e na América do Sul (ROGERS & APPAN 1973). Renvoize (1972) a partir de seus estudos, sugeriram a região brasileiro–paraguaia como centro de origem do gênero *Manihot*, por existir nessa região diversas espécies silvestres, estando a maior concentração no Centro - Oeste brasileiro. Essa proposta foi sustentada por muito tempo, baseando-se na teoria de Vavilov, que sugere que o centro de origem de uma espécie é o local onde está o seu maior índice de diversificação.

Tempos depois, com estudos mais aprofundados, essa proposta foi embatida quando Harlan (1951 *apud* Crepaldi 1992) afirmou que o centro de origem de uma espécie pode ocorrer longe do seu centro de diversidade, validando suas condições de dispersão e formando assim, diversos microcentros.

Com os estudos mais avançados de Rogers & Appan (1973), foi identificado que as espécies do gênero *Manihot*, tendem a ser endêmicas, ou restritas a pequenas áreas. Nassar (1978; 2002) identificou quatro centros de diversidade para estas espécies: 1)México, 2)Centro-Oeste do Brasil, 3)Nordeste do Brasil, 4)Sul do Mato Grosso do Sul do Brasil e Bolívia. Nassar (1982) atribuiu a formação desses microcentros à ocorrência de hibridação frequente entre as espécies e à topografia diversificada dos seus habitats, que tendem a isolar conjuntos de genes pequenos, levando à especiação.

Segundo Rogers & Appan (1973), das 98 espécies do gênero *Manihot* identificadas, cerca de 80% ocorrem no Brasil. Martins (2013) afirma que, com a intensificação dos estudos taxonômicos e filogenéticos, os dados sobre o número de espécies de *Manihot* e sua distribuição, vêm sendo constantemente atualizados.

Classificação do gênero – Taxonomia

A família Euphorbiaceae é uma das mais diversificadas e complexas das Angiospermas, sendo a maior da ordem Malpighiales, compreendendo 246 gêneros e aproximadamente 6.300 espécies (ORLANDINI *et al.* 2013). Entre as Euphorbiaceae, o gênero *Manihot* é reconhecido por apresentar hábito variando do subarborescente a arbóreo, ou até mesmo lianescente, com látex sempre presente, todavia, produzido em diferentes quantidades (RODRIGUES 2007). A presença do ácido cianídrico é uma característica do gênero.

As folhas são normalmente lobadas, com tonalidades purpúreas, com lobos variando em número e profundidade, ou raramente compostas. As estípulas estão presentes e podem ser, caducas ou persistentes na planta madura. As inflorescências são do tipo racemosas ou paniculadas com duas flores pistiladas basais, acompanhadas por brácteas e/ou bractéolas (ROGERS & APPAN 1973; ORLANDINI *et al.* 2013). Segundo Allem (1984), a forma das brácteas e bractéolas e o padrão de inflorescência, apresentam diferenças úteis para a distinção de espécies do gênero.

Rogers & Appan (1973) consideraram a forma do botão floral estaminado como um caráter importante para a diferenciação de espécies no grupo. As flores pistiladas apresentam cinco sépalas que podem ser livres ou completamente unidas. Os frutos são do tipo encapsulados, apresentando deiscência. As sementes apresentam na região da micrópila, carúncula pouco, ou muito desenvolvida, e endosperma abundante.

Segundo Duputié *et al.* (2011) a variação morfológica em *Manihot* conduziu a taxonomia do gênero à características que não são tão palpáveis para total diferenciação das espécies, necessitando estudos mais avançados, como uso de marcadores moleculares, estudos filogenéticos, citogenéticos e anatômicos, para uma definição taxonômica mais completa.

Rodrigues (2007), afirma que a primeira citação de *Manihot* foi feita por Bauhin em 1651, citando *Manihot theveti*.

A primeira monografia sobre o gênero *Manihot* foi publicada por Pohl (1827), listando 48 espécies baseando-se na diferença de ácido cianídrico. Pax

(1910) publicou um trabalho sobre *Manihot* e elaborou chaves de identificação para todos os táxons.

Diversos autores como Mueller (1866), Ule (1914), Croizat (1942) e Cruz (1965) contribuíram para a taxonomia do gênero. Na última revisão do gênero, Rogers & Appan (1973) identificaram 98 espécies dividindo-as em 19 seções distribuídas por toda Região Neotropical. Allem (1993), com estudos do grão de pólen, também contribuiu para a taxonomia do gênero. Mais recentemente, Martins *et al.* (2014) identificaram novas espécies de *Manihot* com ocorrência no Nordeste do Brasil.

Hibridação no gênero *Manihot*

Segundo Nassar (2000) o gênero *Manihot* possui fracas barreiras de isolamento reprodutivo entre as espécies, facilitando assim a ocorrência de hibridação interespecífica, podendo ser ela natural ou artificial. Essas fracas barreiras estão relacionadas com o comportamento meiótico das espécies.

As espécies de *Manihot* são consideradas alotetraplóides com $2n = 36$ e um número básico $x = 9$ (CARVALHO & GUERRA 2002). Sendo assim, acredita-se que essas espécies tenham sido diploidizadas ao longo do processo evolutivo apresentando atualmente, o comportamento típico de um diplóide, resultando no isolamento reprodutivo fraco, permitindo a hibridação interespecífica. Nassar *et al.* (2002) também atribui o isolamento reprodutivo, conseqüentemente à hibridação e à formação dos microcentros dentro do gênero, formando conjuntos de novos genes, levando à especiação. *Pools* de genes heterozigotos são assim criados, seguidos de diferenciação, iniciando um ciclo de hibridação, seguido de especiação (NASSAR *et al.* 2002).

A hibridação tem exercido uma importante funcionalidade no desenvolvimento de variabilidade no gênero *Manihot* (ROGERS & APPAN, 1973). Rodrigues (2007), afirma que um grande número das espécies silvestres do gênero *Manihot* podem ter sido desenvolvidas a partir de cruzamentos interespecíficos.

Hibridação natural ocorre entre as espécies de *Manihot* selvagem e entre estas espécies e a mandioca (NASSAR, 1979; 1984). Na região do

Semiárido brasileiro, na Caatinga, existe alguns híbridos naturais, devido à adjeção do período de floração das espécies dessa região (NEVES *et al.* 2010), entretanto, não existe ainda, nenhum conhecimento sobre os parentais. Nassar (1984) identificou os primeiros híbridos naturais entre *Manihot reptans* e *Manihot alutacea*. Existem também relatos de híbridos naturais entre *Manihot caerulescens* Pohl e *Manihot tripartita* (NASSAR *et al.* 2008), entre *Manihot hilariana* e *Manihot salicifolia* (BRONDANI 1996); beneficiados pelos habitats naturais simpátricos.

Parte desses híbridos naturais são considerados férteis (CARVALHO & GUERRA 2002), podendo ser utilizados para trabalhos de melhoramento vegetal, com possibilidade de transferência de genes de interesse para as espécies cultivadas e também fazer uso desses recursos genéticos para a conservação das espécies do gênero *Manihot*. Apesar da hibridação resultar na transferência de características entre espécies, os híbridos formados também podem ser estéreis ou a população desses híbridos pode não apresentar as combinações de interesse desejadas devido à incompatibilidade entre as plantas (BRIGGS & KNOWLES 1967).

Características e análises moleculares do Gênero *Manihot*

Nos últimos anos, houve aumento significativo no uso de metodologias de genética molecular e citogenética de forma a auxiliar e aumentar eficiência dos programas de melhoramento, na conservação e nas estratégias de melhor uso dos recursos genéticos vegetais.

Sendo o gênero *Manihot* de origem recente (DUPUTIÉ *et al.* 2011), ferramentas da biologia molecular e citogenética somada às características morfológicas, podem facilitar o reconhecimento de táxons, desde que sejam acompanhadas do conhecimento natural e de sua distribuição geográfica (MARTINS 2013), para que as incertezas do passado, na taxonomia do gênero, não sejam repetidas.

Comparado com as características fenotípicas, marcadores moleculares possuem a vantagem de não serem influenciados pelo ambiente, serem encontrados em qualquer tecido e possuírem alto grau de polimorfismo

genético (FALEIRO 2007). Esses marcadores são empregados com sucesso em estudos da origem, evolução e domesticação (OLSEN *et al.* 2001); estudos de diversidade genética e construção de mapas genéticos (SOTO *et al.* 2015); estudos de parentesco entre espécies silvestres do gênero *Manihot* e espécies cultivadas (CABRAL *et al.* 2000) e identificação de hibridação natural (NASSAR *et al.* 2008), dentre outros; informações importantes para subsidiar diferentes tipos de pesquisas, desde a coleta, até o uso dos recursos genéticos em programas de melhoramento de várias espécies.

Os marcadores moleculares, em geral, são baseados na amplificação de fragmentos de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Um dos marcadores que são amplificados via PCR, são os Microssatélites (“SSR-*Simple Sequence Repeats*”). Este marcador compreende uma classe de DNA repetitivo composto de pequenas sequências de 1 a 4 pares de bases repetidos *em tandem*, que se encontram dispersos no genoma (SCHLOTTERER & PEMBERTON, 1998). Os nucleotídeos podem estar repetidos de 5-20 cópias (FIELD & WILS 1996) são marcadores co-dominantes, hipervariáveis, e possuem alto índice de transferabilidade e repetibilidade. Os microssatélites apresentam variações de comprimento entre os alelos, estão distribuídos aleatoriamente no genoma e, embora sejam raros nas regiões codificadoras, se caracterizam pela neutralidade e alto polimorfismo.

Características e análises citogenéticas do Gênero *Manihot*

Citogeneticamente, o gênero *Manihot* possui um cariótipo $2n = 36$ e $n = 18$ para todas as espécies estudadas até o momento (GUERRA & CARVALHO, 1999; NASSAR *et al.* 1995; UMANA & HARTMANN, 1973), e são consideradas alotetraplóides tendo número básico $x = 9$. Segundo Carvalho & Guerra (2002), ao longo da evolução do gênero, é possível que as espécies tenham sido diploidizadas, apresentando nos dias atuais, um comportamento cromossômico típico de uma espécie diplóide.

Na citogenética molecular, a análise cromossômica tem sido de grande importância para o entendimento da evolução, genética e estabilidade

cariotípica dos materiais estudados (BRAMMER *et al.* 2007). Por muito tempo, a caracterização cromossômica foi baseada principalmente em parâmetros morfológicos, como o tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias (BRASILEIRO-VIDAL & GUERRA, 2002). Segundo Carvalho *et al.* (2009), o aprimoramento das análises carotípicas, tem possibilitado a identificação do polimorfismo cromossômico numérico ou estrutural entre os cariótipos e a descrição da homologia cariotípica em cultivares ou espécies. Essas análises fornecem informações importantes, como alterações cromossômicas, taxa de fertilidade, percentual dos genomas parentais nos híbridos, e também fornecem subsídios aos trabalhos de cruzamentos, contribuindo na pré-seleção de linhagens progenitoras e/ou determinando o percentual de genomas parentais nos indivíduos híbridos.

Assim como os marcadores de DNA, os marcadores citogenéticos se expressam independente das variações ambientais ou da ativação gênica, tornando os caracteres avaliados altamente confiáveis (BRAMMER *et al.* 2007).

Um grande marco da transição da citogenética convencional para a citogenética molecular foi a implementação da Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), descrita por Pardue e Gall (1969). Essa técnica permite analisar os efeitos gerados pelo comportamento dos cromossomos durante a divisão celular e identificar polimorfismos cromossômicos causados por diferenças entre sequências de DNA repetitivo em diferentes espécies e híbridos (HESLOP-HARRISON & SCHWARZACHER, 2011). Com o uso da hibridização *in situ*, muitas sequências de DNA têm sido visualizadas, desde cópias únicas ou baixo número de cópias, até aquelas altamente repetitivas.

Com o aprimoramento da hibridização *in situ*, Schwarzacher *et al.* (1989) realizaram algumas modificações na Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), originando uma segunda técnica denominada Hibridização Genômica *in situ* (GISH). Essa técnica utiliza como sonda o DNA genômico total de uma espécie, permitindo a marcação de cromossomos ou de braços cromossômicos uniformemente (BRASILEIRO-VIDAL *et al.* 2005; CHEN *et al.* 2005).

Com o uso dessa técnica, espécies oriundas de cruzamentos naturais ou artificiais podem ter sua origem parental identificada a partir de cada

cromossomo das células híbridas. A GISH foi utilizada pela primeira vez no estudo da organização genômica em parentais de um híbrido intergenérico de *triticum x secale* (LEITCH *et al.* 1989; SCHWARZACHER *et al.* 1989).

Atualmente, tem sido utilizada em plantas com origem aloploplóides ou provenientes de cruzamentos interespecíficos (BRASILEIRO-VIDAL *et al.* 2005; CHEN *et al.* 2005). Guerra (2002) fez uso dessa técnica para analisar o comportamento da meiose de híbridos poliplóides. Brasileiro-Vidal *et al.* (2005) realizou a partir da GISH, estudos de similaridade genômica, afim de distinguir os cromossomos dos diferentes parentais em híbridos interespecíficos e suas progênes de retrocruzamentos.

Nesse sentido, a GISH tem sido extensivamente utilizada com grande sucesso em diversos gêneros de plantas, como por exemplo, no gênero *Jatropha* (SOUZA, 2014) da família Euphorbiaceae. Entretanto, no gênero *Manihot*, ainda não existem trabalhos utilizando a GISH para nenhuma das espécies catalogadas.

Características e análises anatômicas do Gênero *Manihot*

Caracteres anatômicos têm sido usados na análise taxonômica e evolutiva para diversos gêneros do mundo vegetal. Esses caracteres dos órgãos vegetativos fornecem subsídios para complementar as características morfológicas, sendo usados para solucionar questionamentos taxonômicos. Informações sobre a anatomia dos órgãos vegetais ainda são lacunas dentro do gênero *Manihot* devido à existência de características que se sobrepõem entres as diferentes espécies.

Segundo Cunha Neto *et al.* (2014), anatomicamente, sabe-se que a superfície adaxial das folhas de *Manihot* é coberta por camadas de substâncias lipídicas. A maioria dos estômatos estão localizados sobre a superfície abaxial da epiderme e somente alguns poucos são encontrados ao longo da nervura principal na face adaxial. Os estômatos da superfície adaxial apresentam tamanho maior do que os da superfície abaxial. Ambos são morfológicamente paracíticos, com duas pequenas células-guarda envolvidas por duas células subsidiárias.

Vannucci (1982) foi o precursor com seus trabalhos em análises anatômicas em espécies silvestres do gênero *Manihot*. De acordo com Vannucci (1982) Cunha Neto *et al.* (2014) trabalhos anatômicos com espécies nativas ainda são escassos, sendo que basicamente toda a literatura disponível referencia-se à *Manihot esculenta crantz*.

Estudos mais abrangentes sobre a anatomia de espécies silvestres do gênero *Manihot*, foram realizados por Allem (1984) que analisou a anatomia do pecíolo, o tipo de venação, a disposição da cutícula e a morfologia das células epidérmicas. Nassar *et al.* (2010), também abordou estudos relacionados com a estrutura anatômica de diferentes tipos de cultivares e de espécies silvestres do gênero *Manihot*, conhecidas por possuírem características de tolerância à seca. Ainda de acordo com Nassar *et al.* (2011), estudos sobre anatomia radicular de espécies silvestres e cultivares do gênero *Manihot* foram realizados, afim de se adquirir informações para a cultura, fornecendo assim maior suporte para os programas de melhoramento.

Embora a utilidade aparente da anatomia para análise de híbridos ainda seja subestimada quanto ao seu uso, estudos vêm mostrando grandes avanços em relação a esse fato. Esau (1977); Dickison (2000); Balsamo *et al.* (2003), Piwczynski *et al.* (2013) usaram em seus trabalhos as características: presença de hipoderme, organização do mesofilo, desenvolvimento do parênquima paliçádico e presença de espaços intercelulares, como caracteres chaves para identificação de híbridos quando comparados a seus pais, entre as espécies vegetais estudadas.

Espécies: Foco do presente estudo

As espécies silvestres do gênero *Manihot* representam uma importante reserva genética. Assim sendo, essa reserva pode ser utilizada em programas de melhoramento e conservação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta crantz*), podendo, por meio de técnicas biotecnológicas, transferir e/ou identificar determinados genes que possam ser úteis na solução dos principais problemas bióticos e abióticos da cultura.

A constante aniquilação do meio ambiente proveniente do desmatamento para formação de pastagens, implantação das monoculturas e acidentes ambientais, como as queimadas, tem levado essa base genética tão preciosa, para uma zona de risco de extinção.

O Brasil possui grande diversidade genética de *Manihot*, com espécies distribuídas nos diversos ecossistemas. Dentre elas, endêmicas do nordeste brasileiro, estão a *M. reniformis* Pohl e a *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins sp. nov. Ined.

Manihot reniformis (Figura1 A – G) é uma espécie endêmica da Chapada Diamantina, Bahia (MARTINS, 2013). Seu primeiro registro foi feito na Serra de Sincorá, 1818 (POHL 1827). É um arbusto ereto, de caule liso, ramos cilíndricos e pouco ramificados e possui látex branco em bastante quantidade. Suas folhas, a maior característica de diferenciação desta espécie, são simples, inteiras, glabras, verdes, com nervuras purpúreas, face abaxial mais clara, limbo disposto paralelamente ao eixo do caule, reniforme ou cordiforme, ápice acuminado, base cordada, margem inteira e nervura camptódroma. Sua inflorescência é racemosa com flores rosadas e púrpuras no ápice. Os frutos são encapsulados e apresentam deiscência, ovais com superfície lisa, sendo a parte basal verde e o ápice da cor púrpura.

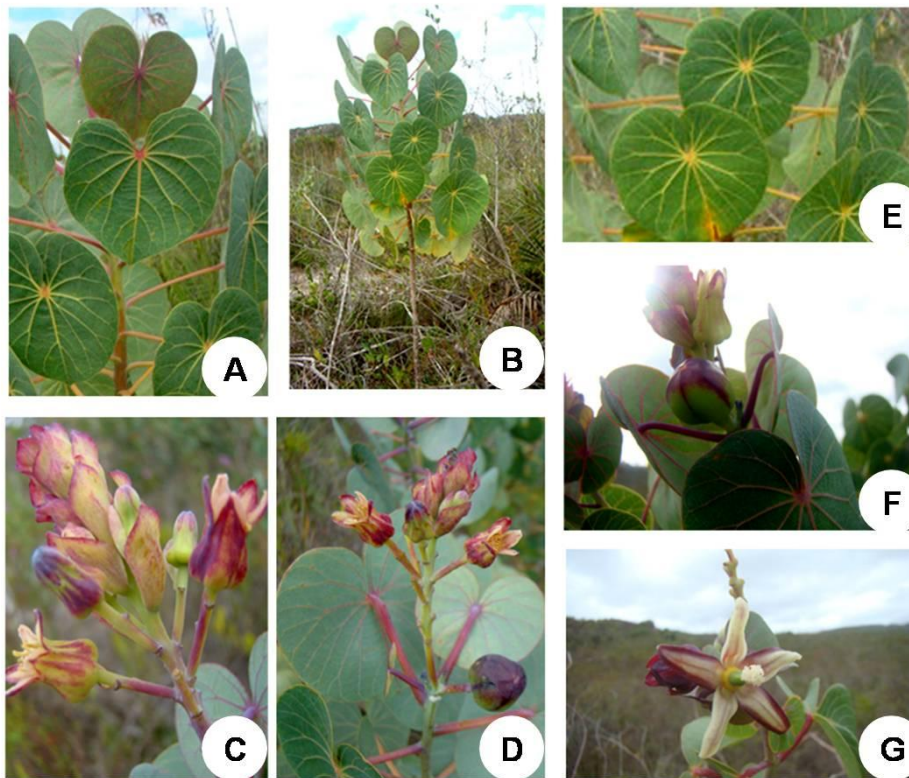


Figura 1 (A – G): Aspectos morfológicos de *M. reniformis*. A e E – Detalhe da folha e do pecíolo; B – Aspecto geral da espécie em campo; C e D – Inflorescência e fruto respectivamente; F – Detalhe do fruto; G – Flor feminina.

A *Manihot reflexifolia*, também endêmica da Chapada Diamantina, Bahia, mais precisamente da região de Lençóis e Mucugê, foi reconhecida como uma nova espécie para a ciência por Carvalho & Martins (MARTINS 2013), com base em diferenças no formato do pecíolo e da folha. O autor citou ainda a sua semelhança com espécies da seção *Quinquelobae* Pax & Hoffm, como referendado por Cunha Neto *et al.* (2014).

A *Manihot reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins (Figura 2 A – G) apresenta populações bem representadas no município de Mucugê, Bahia, em áreas de campo rupestre, onde chega a alcançar 3 metros de altura (MARTINS, 2013). É arbusto ereto, com ramos decumbentes, látex branco e levemente creme. Suas folhas são simples, 3-5 lobos, face abaxial mais clara, ápice acuminado, inflorescência racemosa, terminal, flores estaminadas comumente localizadas na metade superior do eixo da inflorescência e coloração purpúrea. Possui frutos verdes com linhas purpúreas sobre os

septos, orbiculares a ovóides, às vezes curvos, superfície lisa e ápice arredondado São encapsulados e apresentam deiscência.

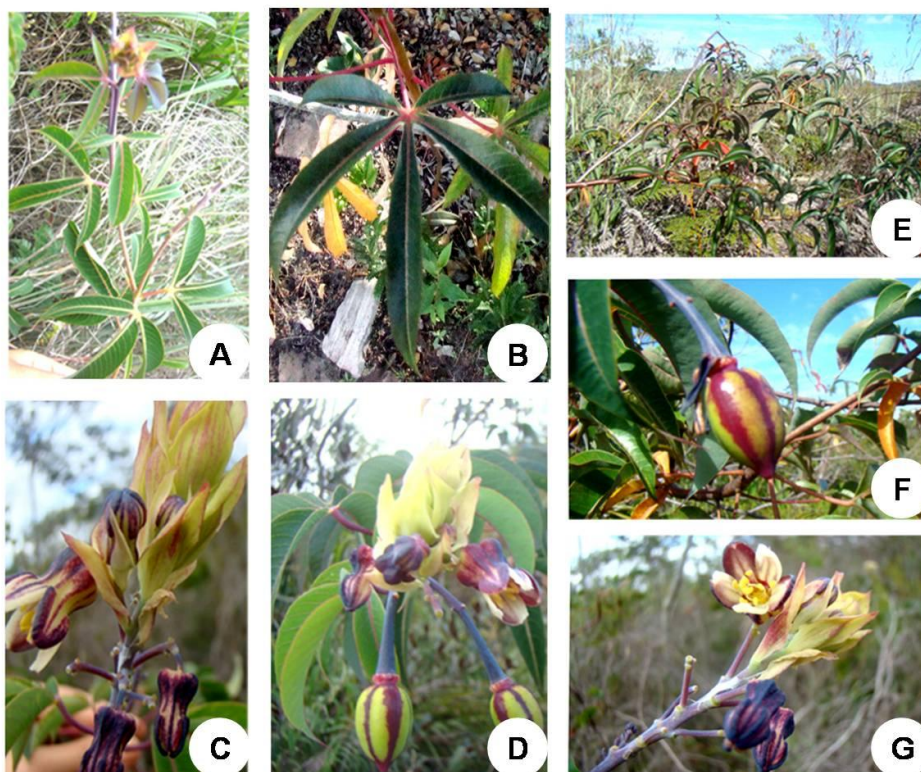


Figura 2(A – G): Morfologia de *M. reflexifolia*. A e B – Detalhe da folha; C e D – Inflorescência e frutos; E – Aspecto geral da espécie em campo; F – Detalhe do fruto; G – Flor masculina.

Populações dessas duas espécies, *M. reniformis* e *M. reflexifolia*, são encontradas no município de Mucugê, na Chapada Diamantina – Bahia, nas mediações da rodovia BA-142, com concentrações dentro do Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM) - Projeto Sempre Viva. Essas espécies possuem distribuição simpátrica nos locais de ocorrência e entre elas, foram localizados indivíduos sendo caracterizados como prováveis híbridos naturais por terem evidentes características morfológicas compartilhadas entre *M. reniformis* Pohl X *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins (Figura 3A – G), alvos deste trabalho.

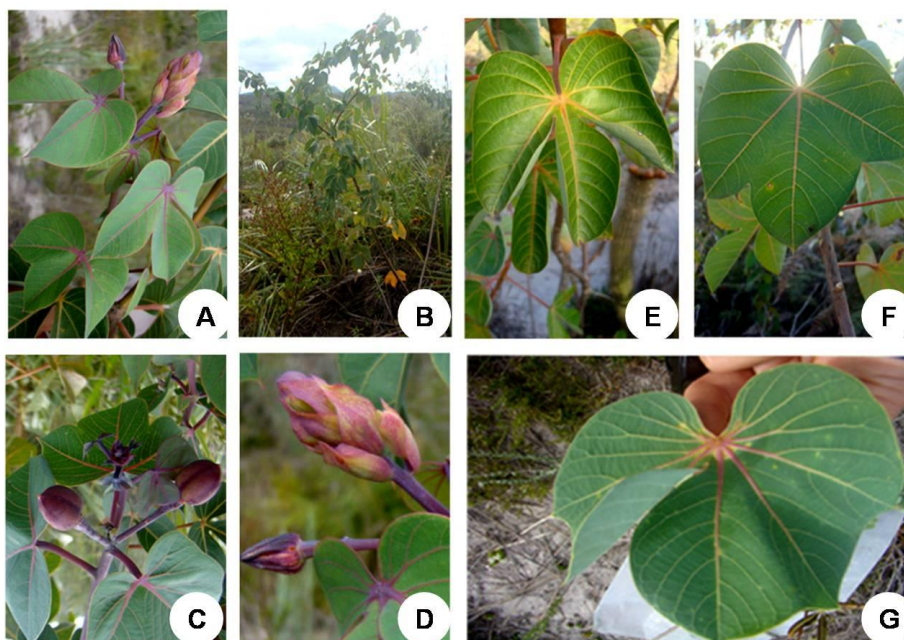


Figura 3 (A – G): Morfologia dos prováveis híbridos encontrados. A – Detalhe da folha; B – Aspecto geral de um dos indivíduos no campo; C e D – Detalhe do fruto e da inflorescência com uma flor feminina ainda em seu estágio de maturação; E, F e G – Diferentes morfologias de folha apresentada pelos híbridos.

Para o gênero *Manihot* ainda não foram definidos caracteres morfológicos universais que auxiliem na taxonomia do gênero, entretanto existem alguns caracteres que são muito importantes para identificação de novas espécies, características estas ligadas altamente a morfologia foliar. Sendo assim, para *Manihot*, as análises de dados anatômicos, moleculares e citogenéticos são ferramentas importantes para a taxonomia do gênero, contribuindo para a identificação de novas espécies, evitando erroneamente a classificação de espécies ao grupo.

Esse estudo tem como objetivo geral identificar e caracterizar supostos híbridos naturais do gênero *Manihot* e seus possíveis genitores, *M. reniformis* Pohl e *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins sp. nov. Ined., a partir de técnicas de anatomia foliar, biologia molecular, citogenética.

REFERÊNCIAS

Allem, A.C. A Revision of *Manihot* section *Quinquelobae* (Euphorbiaceae). Tesis. Department of Botany. University of readin, v. 1-2., p.399, 1984.

Allem, A.C. Palinotaxonomy of *Manihot* section *Quinquelobae* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 53, p.71-79, 1993.

Balsamo, R.A.; Bauer, A.M.; Davis, S.D.; Rice B.M. Leaf biomechanics, morphology, and anatomy of the deciduous mesophyte *Prunus serrulata* (Rosaceae) and the evergreen sclerophyllous shrub *Heteromeles arbutifolia* (Rosaceae). *American Journal of Botany*. 2003.

Bomfim, N. N.; Graciano-Ribeiro, D.; Nassar, N. M. Genetic diversity of root anatomy in wild and cultivated *Manihot* species. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, p. 544-551, 2011.

Brammer, S.; Zanotto, M.; Caverzan, A. *Citogenética vegetal: Da era clássica à molecular*. Embrapa Trigo, 2007.

Brasileiro-Vidal, A. N.; Guerra, M. *Citogenética molecular em cereais*. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). *Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal*. Embrapa Trigo, 2002.

Brasileiro-Vidal, A. C.; Cuadrado, A.; Brammer, S. P.; Benko - Iseppon, A. M.; Guerra, M. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, p. 308-313, 2005.

Briggs, F. N.; Knowles, P. F. *Introduction to plant breeding*. California, 1967.

Brondani, C. Análise Isoenzimática de dois híbridos putativos naturais de espécies sivistres do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae). Revista Brasileira de agropecuária, v. 31, p. 639 – 643, 1996.

Cabral, G. B.; Carvalho, L.J.; Schaal, R. A. Relationship analysis of closed related species to cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on microsatellite-primed PCR. In: International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, Salvador, 1998. Proceedings... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 36-50, 2000.

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

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

Carvalho, R.; da Silva, K. V. P.; de Oliveira, I. F.; Alves, A. A. C. Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot*. Revista Raízes e Amidos Tropicais, v. 5, p. 645-650, 2009.

Chen, Q. Detection of alien chromatin introgression from *Thinopyrum* into wheat using S genomic DNA as a probe – A landmark approach for *Thinopyrum* genome research. Cytogenetic and Genome Research, v. 109, p. 350-359, 2005.

Crepaldi, I.C. Origem, evolução e geografia da mandioca: uma revisão. *Sitientibus*, v. 10, p. 89-94, 1992.

Croizat, L. Preliminari per uno Studio Del genere *Manihot* nell' America Meridionale. Revista Argentina de Agronomia, v.10, p. 213-226, 1943.

Cruz, N.D. Nova espécie do gênero *Mainihot* Adains do estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 24, p.359-368, 1965.

Cunha Neto, I. L.; Martins, F. M.; Caiafa, A. N.; Martins, M. L. L. Leaf anatomy as subsidy to the taxonomy of wild *Manihot* species in Quinquelobae section (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Botany*, v. 37, p. 481-494, 2014.

Dickison, W.C. Integrative plant anatomy. Academic Press, San Diego, 2000.

Duputié, A.; Salick, J.; McKey, D. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. *Journal of Biogeography*, 2011.

Esau, K. Anatomy of seed plants. John Wiley & Sons, New York, 1977.

Faleiro, F. G. Marcadores genético-moleculares. Planaltina: Editora Embrapa, v. 1, p. 102, 2007.

Field, D.; Wills, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 263, p. 209-215, 1996.

Heslop-Harrison, J. S. P.; Schwarzacher, T. Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, v. 66, p. 18–33, 2011.

Leitch, K.C., Miki, B. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 7, p. 150–158, 1989.

Martins, M.L.L. Avanços taxonômicos em *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) do Brasil. Tese de doutorado. Departamento de Botânica. Universidade Estadual de Feira de Santana. 2013.

Martins, M.L.L.; Carvalho, P.C.L.; Amorim, A.M.A. A rearkable *Manihot* (Euphorbiaceae) from the coastal sand plains of Sergipe, Brazil. *Phytotaxa*. v. 32, p. 57-60, 2014.

Mueller, J. (Muell.-Arg.) (1866). In: De Candolle, *Prodromus*, v.15, p. 1063-1075.

Nassar, N.M.A. Conservation of the Genetic Resources of Cassava (*Manihot esculenta*): Determination of Wild Species Localities with Emphasis on Probable Origin. *Economic Botany*, v. 32, p. 311-320, 1978.

Nassar, N.M.A. A study of the collection and maintenance of the germplasm of wild cassavas, *Manihot* spp. *Turrialba*, v. 29, p. 221-224, 1979.

Nassar, N.M.A. Collecting wild cassava in Brazil. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, v. 42, p. 405-411, 1982.

Nassar, N.M.A.; Nassar, H.N.M.; Vieira, C.; Saraiva, S.L. Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and its backcross progeny. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 75, p. 675-678, 1995.

Nassar, N.M.A. Cytogenetics and evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genetics and Molecular Biology*, v.23, p. 1003-1014, 2000.

Nassar, N.M.A. Has *Manihotoides pausiflora* Rogers & Appan, a cassava relative become extinct? fic hybridization. *Canadian Journal of Plant Science*, 2002.

Nassar, N.M.A. Chromosome doubling induces apomixis in cassava x *Manihot anomala* hybrid. *Hereditas. Genetics and Molecular Research*, v.143, p. 246-248, 2006.

Nassar, N.M.A.; Hashimoto, D.Y.C.; Fernandes, S.D.C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. *Genetics and Molecular Research*, v.7, p. 16-28, 2008.

Nassar, N. M. A.; Abreu, L. F. A.; Teodoro, D. A. P.; Graciano-Ribeiro, D. Drought tolerant stem anatomy characteristics in *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) and a wild relative. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, p. 1023-1031, 2010.

Neves, E.L.; Funch, L.S.; Viana, B.F. Comportamento fenológico de três espécies de *Jatropha* (Euphorbiaceae) da Caatinga, semi-árido do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 33, p. 155-166, 2010.

Olsen, K.M.; Schaal, B.A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relative species: further evidence for a southern Amazonian prigin of domestication. *American Journal of Botany*, 2001.

Orlandini, P.; Lima, L.R. Sinopse do gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Hoehnea*, v. 41, p. 51-60, 2013.

Pardue, M L.; Gall, J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 64, p. 600-604, 1969.

Pax, F. *Manihot* Adans. In: *Engler Pflanzenreich*, v.147, p. 21-111, 1910.

Piwczyński, M.; Ponikierska, A.; Puchałka, R.; Corral, J. M. Expression of anatomical leaf traits in homoploid hybrids between deciduous and evergreen species of *Vaccinium*. *Plant Biology*, v. 15, p. 522-530, 2013.

Pohl, J. *Plantarum Brasiliae Icones et Descriptiones*, v. 1, p. 17-56, 1897.

Renvoize, B. S. The area of origin of *Manihot esculenta* a crop plant a review of the evidence . *Economy Botany*, v. 26, p.352-360, 1972.

Rodrigues, A.S. As tribos Dalechampieae Müll. Arg. e Manihotae Melchior (Euphorbiaceae) no Distrito Federal, Brasil. Dissertação. Departamento de Botânica. Universidade de Brasília, 2007.

Rogers, D.J.; Appan, S.G. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): A Computer Assisted Study. Flora Neotropica. Monograph. Hafner Press, New York, 1973.

Schlotterer, C.; Pemberton J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations - a critical review. In: DeSalle R and Schierwater Molecular Approaches to Ecology and Evolution. Birkhäuser Verlag Basel, 1998.

Schwarzacher, T.; Leitch, A.R.; Bennett, M.D.; Heslop-Harrison, J.S. In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*, 1989.

Soto, J.; Ortiz, J.F.; Perlaza-Jiménez, L.; Vásquez, A. X.; Lopez-Lavalle, L.A.; Mathew, B. A genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with integrated physical mapping of immunity-related genes. *BMC Genomics*, v. 16, p. 1, 2015.

Souza, R.C. Caracterização citogenética de híbridos de *Jatropha curcas* L. e espécies relacionadas. Dissertação. Departamento de Agronomia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.

Ule, E. Beitrage zur Kenntnis der brasilianischen *Manihot*-Arten. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, v. 50, p.12, 1914.

Umanah, E.E.; Hartmann, R.W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. *J Am Soc Hortic Sci*, v. 98, p.272- 274, 1973.

Vannucci, A. L. Anatomia Comparada de Duas Espécies Nativas de *Manihot Mill.* (Euphorbiaceae). Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. 1992

CAPÍTULO I

ANATOMIA FOLIAR COMO SUBSÍDIO PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS NATURAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *MANIHOT*

¹ O artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico *Annals of Botany*.

ANATOMIA FOLIAR COMO SUBSÍDIO PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS NATURAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *MANIHOT*

Resumo: Este trabalho tem por objetivo caracterizar a anatomia foliar das espécies silvestres *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos seus possíveis híbridos naturais, identificando caracteres anatômicos de importância taxonômica que identifiquem essas espécies silvestres como progenitores dos supostos híbridos. Amostras de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos seus possíveis híbridos foram coletadas no Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM), Projeto Sempre Viva, localizado na cidade de Mucugê – Bahia. A anatomia foliar das espécies foi analisada por meio de microscopia óptica e eletrônica de varredura, a fim de obter caracteres úteis para caracterização e identificação desses indivíduos. A anatomia foliar mostrou-se eficiente para caracterizar *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e os híbridos e identificar os dois primeiros táxons silvestres como parentais dos híbridos (*M. reflexifolia* X *M. reniformis*), a partir dos caracteres anatômicos considerados mais importantes dentro deste estudo: morfologia do pecíolo e da nervura central, a extensão da bainha dos feixes, a organização e quantidade de grupos de feixes vasculares, a organização e composição do mesofilo, e a presença de papilas epidérmicas.

Palavras – chave: anatomia foliar; feixes vasculares; hibridação natural; nervura central

LEAF ANATOMY IN THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NATURAL HYBRIDS OF WILD SPECIES OF THE *Manihot* GENUS

Abstract: The objective of the present work was to characterize the leaf anatomy of the wild species of *M. reflexifolia*, *M. reniformis* and of their possible natural hybrids, identifying anatomical characteristics of taxonomic importance which identifies these wild species as progenitors of the possible hybrids. Samples from *M. reflexifolia*, *M. reniformis* and of their possible hybrids were collected in the Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM), Projeto Sempre Viva, located in the city of Mucugê – Bahia. The leaf anatomy of the species was analyzed by optical and scanning electron microscopy in order to obtain useful characteristics and identification of these individuals. Leaf anatomy was efficient to characterize *M. reflexifolia*, *M. reniformis* and the hybrids, and also to identify the first two wild taxons as progenitors of the hybrids (*M. reflexifolia* X *M. reniformis*), from the most important anatomical characteristics in this study: petiole and midrib of morphology, extension of the sheath of the bundles, organization and quantity of groups of vascular bundles, organization and composition of the mesophyll and presence of epidermal buds.

Key-words: leaf anatomy, vascular bundles; natural crosses, central midrib.

Introdução

O gênero *Manihot* é representado por 98 espécies distribuídas por toda região Neotropical, onde o Brasil é considerado o maior centro de diversidade do gênero, assegurando 80% dessas espécies com grande representação da variabilidade genética (ROGERS & APPAN 1973).

A identificação de novas espécies é de suma importância para a manutenção do gênero, identificando novas potencialidades que subsidiam pesquisas de conservação e melhoramento genético da mandioca.

A anatomia vegetal é considerada uma grande ferramenta para auxiliar a taxonomia do gênero, apesar de serem poucas as informações disponíveis acerca da anatomia do gênero *Manihot*. As mais notáveis contribuições foram iniciadas por Viègas (1940), que produziu uma descrição anatômica de partes vegetativas em *Manihot utilissima* Pohl (sinônimo de *Manihot esculenta*); Mendonça (1992), que observou lâminas foliares de *Manihot caerulescens* Pohl e *M. glaziovii* Müll. Arg.; Vannucci (1982) contribuiu descrevendo parte da anatomia de espécies silvestres do gênero *Manihot*, e Rudall (1994), que identificou em seus estudos tipos de laticíferos em Crotonoideae, subfamília a qual pertence o gênero.

Atualmente os trabalhos que objetivaram identificar espécies ou identificar potencialidades do gênero *Manihot*, fazendo uso da anatomia vegetal, foram os trabalhos de Nassar *et al.* (2008), que estudaram a anatomia de uma cultivar de mandioca; e Cunha Neto *et al.* (2014) que analisaram cortes histológicos de espécies silvestres do gênero *Manihot*.

Segundo Dickison (2000), o uso da anatomia para a identificação de hibridação é feito normalmente associado a outras fontes de dados, como fisiológicos, morfológicos, citológicos e moleculares. O uso da anatomia vegetal para análises de híbridos ainda é pouco utilizada, entretanto, nos últimos anos, a anatomia vegetal atrelada a outras técnicas, vem se mostrando uma importante ferramenta para estudos que objetivam identificação de híbridos. Caracteres como nervura da folha, padrão de venação e características epidérmicas, foram utilizados para identificar o material híbrido de gramíneas

(*Salvia apiana* Jeps x *Salvia mellifera* Greene) (DICKISON, 2000). Cada uma dessas características pode apresentar semelhança entre os pais.

Esau (1977); Dickison (2000); Balsamo *et al.* (2003), analisaram em seus estudos, a presença de hipoderme, organização do mesofilo, desenvolvimento do parênquima paliçádico e presença de espaços intercelulares, como caracteres para identificação de híbridos, entres as espécies vegetais estudadas. Entretanto, para Scareli-Santos *et al.* (2007) o caráter de maior valor anatômico em seus estudos, para indentificar os híbridos a partir de uma comparação com seus pais, foram as características epidérmicas.

Piwczynski *et al.* (2012) realizou o trabalho mais recente de identificação de híbridos de *Vaccinium*. Nesse estudo investigou-se a anatomia da folha de híbridos e as características foliares anatômicas também mostraram-se como uma poderosa ferramenta de diversidade de expressão nos híbridos e seus pais.

Segundo Nassar *et al.* (2005), as fracas barreiras de isolamento reprodutivo existentes entre as espécies do gênero *Manihot*, facilita a ocorrência de hibridação interespecífica. Nos Campos Rupestres da Chapada Diamantina, mais precisamente na cidade de Mucugê, na Bahia, existem duas espécies simpátricas, *M. reniformis* Pohl e *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins sp. nov. inéd.. Nessa mesma região, existem vários indivíduos que apresentam características morfológicas intermediárias e variáveis entre essas duas espécies, que, somado à distribuição simpátrica e à característica do gênero de fácil ocorrência de hibridação interespecífica, sugere que sejam híbridos naturais, oriundos do cruzamento entre *M. reniformis* e a *M. reflexifolia*.

Sendo assim, com o uso das técnicas da anatomia vegetal, esse trabalho tem como objetivo caracterizar indivíduos de *M. reniformis*, *M. reflexifolia* e dos prováveis híbrido naturais, e identificar se *M. reniformis* e *M. reflexifolia* são progenitores dos híbridos naturais, selecionados primeiramente, apenas com base nas suas características morfológicas.

Materiais e Métodos

Cortes histológicos

Amostras de *M. reniformis* e *M. reflexifolia* e dos prováveis híbridos, foram coletadas no Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM), Projeto Sempre Viva, localizado na cidade de Mucugê – Bahia. Segmentos de aproximadamente 10 cm do pecíolo e folhas adultas, localizados entre o terceiro e quinto entrenós, foram fixados em FAA50 (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) (JOHANSEN, 1940).

Posteriormente foram levados para o Laboratório de Anatomia e Histoquímica Vegetal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em Cruz das Almas, submetidos a vácuo por 24h e estocados em álcool etílico 70%.

Fragmentos das amostras foram isolados e transferidos para álcool butílico terciário 70, onde permaneceram por aproximadamente sete dias, desidratadas em série butílica e incluídas em parafina histológica (Histosec/Merck; JOHANSEN, 1940). Cortes transversais e longitudinais com espessura variando entre 12 e 18µm foram realizados em micrótomo rotativo (Leica RM2245). Os cortes foram corados com safranina alcoólica 1,5% e azul de astra aquoso 1% (GERLARCH, 1969) e as lâminas permanentes montadas em resina sintética (Permount/Fisher).

As fotomicrografias foram realizadas em microscópio Olympus BX51 equipado com câmera digital Olympus E330. As escalas das figuras foram obtidas através da projeção de uma lâmina micrométrica fotografada/digitalizada nas mesmas condições ópticas das demais ilustrações.

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM – Serviço de Microscopia Eletrônica da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz em Salvador, Bahia.

As amostras com 5 cm² foram desidratadas em série etílica, secas ao ponto crítico (modelo CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) utilizando dióxido de carbono líquido, montadas em porta-espécimes e recobertas com uma camada de ouro pelo processo de pulverização catódica (Sputter Coater, modelo FDU 010, Bal- Tec, Balzers, Liechtenstein).

Após o preparo das amostras, as mesmas foram observadas e fotomicrografadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo 1430 VP, Cambridge, Inglaterra).

Resultados

Uma ampla variação na morfologia foliar foi observada entre *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e os possíveis híbridos (Figura 1). *M. reflexifolia* é caracterizada por apresentar folhas simples, 3-5 lobadas, glabras, cartáceas, face abaxial mais clara, ápice acuminado, inteiro, nervura camptódroma. Possui também inflorescência racemosa, terminal, flores estaminadas comumente localizadas na metade superior do eixo da inflorescência, às vezes com flores pistiladas isoladas partindo da base, sendo a maioria com pétalas purpúreas. Os frutos são verdes com linhas purpúreas sobre os septos, orbiculares a ovóides, superfície lisa e ápice apiculado (Figura 1 A, E e H).

M. reniformis apresenta folhas simples, inteiras, glabras, cartáceas, verdes com nervuras purpúreas, face abaxial mais clara, limbo disposto paralelamente ao eixo do caule, reniforme, base cordada. A Inflorescência é racemosa, terminal, as flores congestas, rosadas, purpúreas no ápice e nas margens. Os frutos encontrados em campo apresentaram base verde, ápice e linhas de deiscência purpúreas são orbiculares a levemente ovóides com superfície lisa e ápice arredondado (Figura 1 B, F e I).

Os possíveis híbridos encontrados apresentam semelhanças morfológicas entre as duas espécies supracitadas, dependendo fortemente do estágio de maturação, na qual ele foi encontrado. Apresentam folhas simples com base cordada igualmente às da *M. reniformis*. Ao longo do seu crescimento, essas folhas se dividem formando lobos, podendo ser entre 3 – 5. A inflorescência também é do tipo racemosa, com pétalas purpúreas, apresentando a base um pouco mais rosada. O fruto encontrado e caracterizado é totalmente purpúreo e com linhas marcantes, base oval e ápice apiculado (Figura 1 C, D, G e J).

O pecíolo em secção transversal em *M. reflexifolia* apresentou contorno cilíndrico. Já em *M. reniformis* a morfologia identificada foi de achatado dorsiventralmente, entretanto, os cortes feitos nos supostos híbridos naturais

(*M. reniformis* Pohl x *M. reflexifolia*), mostram que alguns indivíduos apresentam o contorno do pecíolo cilíndrico e outros achatados dorsiventralmente (Figura 2 A – D).

A epiderme é uniestratificada em todos os indivíduos investigados, sendo composta por células arredondadas em seção transversal. A parede periclinal externa com a cutícula apresenta maior espessura nos prováveis híbridos e em *M. reniformis* (Figura 3 A - C).

A composição e disposição do córtex nas duas espécies diferenciam-se bastante, entretanto, nos possíveis híbridos apresentam características compartilhadas por ambas. O córtex observado em *M. reflexifolia* é composto por três a quatro camadas de parênquima clorofiliano; seis a sete camadas de colênquima; oito camadas de células parenquimáticas e três camadas de fibras esclerenquimáticas. As fibras que ocorrem na última camada do córtex formam um anel que envolve o cilindro vascular estando na posição de uma endoderme. As células do colênquima possuem tamanho irregular com espaços intercelulares e as células do parênquima possuem formato arredondado e com poucos espaços intercelulares (Figura 3 D).

M. reniformis apresentou córtex com três camadas de parênquima com células arredondadas, pequenas no tamanho e sem espaços intercelulares. O colênquima é composto por células grandes e alongadas e as células esclerenquimáticas estão dispostas em quatro camadas de células, formando um conjunto de fibras que contorna os feixes vasculares (Figura 3 E)

O córtex dos indivíduos que podem ser considerados híbridos é composto por três camadas de parênquima; seis a sete camadas de colênquima e duas a quatro camadas de esclerênquima. As células do parênquima possuem tamanhos variados, porém o formato arredondado é constante com reduzidos espaços intercelulares. As células do colênquima, nos híbridos com pecíolo cilíndrico, possuem formato arredondado. Já os que possuem formato do pecíolo achatado dorsiventralmente, as células em seção transversal apresentam formato alongado (Figura 3 F e G).

A disposição das células esclerenquimáticas nos prováveis híbridos também está relacionada com a morfologia do pecíolo apresentado pelos mesmos. Os que possuem pecíolo cilíndrico apresentam quatro camadas de

células esclerenquimáticas e os com morfologia achatada dorsiventralmente apresentam duas camadas de células (Figura 3G).

Em todos os indivíduos estudados foram encontrados idioblastos secretores, com conteúdo denso corado fortemente pela safranina. Eles estão presentes em grande quantidade no córtex. Em *M. reflexifolia* os idioblastos formam uma hipoderme praticamente contínua em toda circunferência do pecíolo. No córtex, foi possível observar idioblastos cristalíferos, com inclusões do tipo drusa. Porém, nos supostos híbridos e em *M. reniformis*, não foi possível identificar nenhum outro tipo de idioblastos, sendo que a presença dos idioblastos secretores é tão acentuada, que ocorre desde o parênquima até os feixes vasculares (Figura 3D- F).

O cilindro vascular, composto pelo xilema e floema primários, está disposto em forma de arco, bastante acentuado, em *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e nos possíveis híbridos (Figura 2 A – D).

O número de feixes vasculares variou entre as espécies e os híbridos. *M. reflexifolia* apresentou entre sete e nove conjuntos de feixes vasculares. *M. reniformis* não apresentou variação em relação a esse carácter, apresentando dez feixes vasculares em todos os indivíduos observados. Já nos indivíduos considerados híbridos, ocorreu uma ampla variação do número de feixes vasculares, ocorrendo indivíduos com cinco, seis, sete ou dez feixes.

A medula é exclusivamente composta por células parenquimáticas. Em *M. reflexifolia*, suas células tem formato uniforme, com tamanhos variados e praticamente sem espaços intercelulares. Devido à morfologia do pecíolo de *M. reniformis*, as células que compõem a medula possuem um formato um pouco mais alongado e tamanhos bem variados. Os supostos híbridos apresentam também células da medula arredondadas, exceto para os híbridos com pecíolo achatado dorsiventralmente, onde as células são um pouco mais alongadas, assim como as apresentadas em *M. reniformis*. No entanto, idioblastos secretores estão restritos à medula de *M. reniformis* e à dos híbridos que possuem pecíolo achatado dorsiventralmente (Figura 2 A – D).

Em secção transversal das lâminas foliares, a nervura em *M. reflexifolia* apresenta curvatura grande na face abaxial e outra curvatura pequena na face adaxial, tendo seu formato biconvexa. Entretanto, em *M. reniformis*, a nervura é

do tipo proeminente, com sua face adaxial pouco pronunciada em relação à face abaxial. Nos possíveis híbridos, alguns indivíduos apresentaram nervura biconvexa, no entanto, em outros indivíduos, observou-se formato proeminente da nervura, tal como identificado em *M. reniformis* Pohl (Figura 5 A – D).

A epiderme da lâmina foliar é semelhante à do pecíolo em todos os indivíduos estudados, inclusive no que se refere à espessura da parede periclinal externa e cutícula.

Nas regiões intervasculares, as células epidérmicas comuns da face abaxial apresentam papilas pronunciadas. Em vista frontal, não é possível visualizar a disposição das células epidérmicas ordinárias, impedindo a caracterização da tipologia dos estômatos. Isto ocorre devido à grande quantidade de papilas, sendo esse caráter bastante enfático em *M. reniformis* (Figura 4 A – F).

Nos cortes transversais foi possível caracterizar as folhas como do tipo hipostomáticas em *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e nos possíveis híbridos. O mesofilo em *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e nos prováveis híbridos é do tipo isobilateral (Figura 6 A – C). Em *M. reflexifolia*, o parênquima paliçádico é composto por uma camada de células voltada para face adaxial da epiderme e uma para a face abaxial. As células da primeira camada são alongadas, com tamanhos bastante uniformes e sem espaços intercelulares aparentes; diferentemente do que acontece com as células da face abaxial do parênquima paliçádico.

As células que compõem a camada de parênquima paliçádico voltado para face abaxial, apresentam variação quanto ao formato, tamanho e espaços intercelulares. O parênquima lacunoso se caracteriza por apresentar células de formato e tamanho irregular com amplos espaços intercelulares (Figura 6 D).

O parênquima paliçádico de *M. reniformis* é composto por uma a duas camadas de células voltadas para a face adaxial da epiderme e com duas a quatro camadas de células voltadas para a face abaxial. Estas células são bem alongadas e com muitos espaços intercelulares, dando uma aparência frouxa e esponjosa para ambas as camadas do parênquima paliçádico. O parênquima lacunoso é composto de células irregulares, apresentando muitos espaços intercelulares (Figura 6 E).

Já o mesofilo dos supostos híbridos é compreendido por células com formato bastante regular e alongadas na face adaxial voltada para o parênquima paliçádico. As células que compõem a face abaxial são bastantes irregulares, com grande presença de espaços intercelulares (Figura 6 F).

Indivíduos possivelmente híbridos apresentaram apenas uma camada de células compondo o parênquima paliçádico, tanto para a face adaxial, quanto para a face abaxial. Outros indivíduos mostraram-se ser compostos por duas camadas de células voltadas para a face abaxial da epiderme e uma camada para face adaxial. O parênquima lacunoso é bastante irregular, quanto ao formato e distribuição de suas células.

A nervura central em *M. reflexifolia* apresenta fibras esclerenquimáticas delimitando o feixe vascular, formando uma grande extensão da bainha. *M. reniformis*, apresenta nervura central composta por células bastante alongadas, células do colênquima arredondadas e sem muitos espaços intercelulares e fibras esclerenquimáticas formando extensão da bainha. Os supostos híbridos apresentam a mesma disposição das fibras esclerenquimáticas, formando uma bainha, tal como, em *M. reflexifolia* e *M. reniformis*. As demais células nos indivíduos analisados são uniformes quanto ao tamanho e formato e sem muitos espaços intercelulares (Figura 5 A - D).

M. reflexifolia, *M. reniformis* e os possíveis híbridos analisados, apresentaram feixe vascular no mesofilo do tipo colateral, com floema voltado para a periferia do órgão e o xilema para o centro (Figura 6 D – F).

Discussão

Dados morfológicos e citológicos, segundo Piwczynski *et al.* (2012), por muitos anos foram a base para estudos de caracterização de híbridos. Scareli-Santos *et al.* (2007) afirma que as análises anatômicas de híbridos foram restritas para as características micromorfológicas da epiderme. Mesmo com trabalhos escassos, Cunha Neto *et al.* (2014), Piwczynski *et al.* (2012), Dickison (2000), mostram que a anatomia dos órgãos da planta oferece uma variedade de caracteres com muitas funcionalidades e interpretações adaptáveis para a caracterização de espécies, estudos taxonômicos e identificação de híbridos.

Dentre as características analisadas o formato do pecíolo se destaca nos táxons estudados. A espécie *M. reflexifolia* possui o contorno do pecíolo cilíndrico, como caracterizado também por Cunha Neto *et al.* (2014) e verificado na maioria das espécies do gênero *Manihot* analisadas por Allem (1984). *Manihot reniformis* Pohl possui o contorno do pecíolo achatado dorsiventralmente; morfologia encontrada por Cunha Neto *et al.* (2014) nas espécies de *M. Jacobinensis*. Já nos híbridos, foram observados os dois tipos de formatos do pecíolo, cilíndrico e achatado dorsiventralmente, uma característica que já evidencia o híbrido pertencente ao cruzamento entre *M. reflexifolia* x *M. reniformis*.

A epiderme é uniestratificada, composta por células arredondadas para todos os táxons estudados. Cunha Neto *et al.* (2014) afirma com seus trabalhos anatômicos para espécies silvestres de *Manihot*, que a espessura da cutícula é uma importante característica anatômica para caracterização de espécies. Sendo assim, foram relevantes para as análises, os resultados de espessamento da cutícula, que se mostraram diferentes. *M. reniformis* e os híbridos apresentaram cutícula mais espessa do que *M. reflexifolia*.

Dentre as camadas de células que compõem o córtex, o que mais se destacou foi a distribuição da quantidade de camadas de célula do esclerênquima. Nos três objetos de estudo, as células esclerenquimáticas formaram fibras contornando o conjunto de feixes vasculares, mas em relação à quantidade de camadas de células, variaram. *M. reflexifolia* possui três camadas de células esclerenquimáticas envolvendo os feixes vasculares, *M. reniformis* quatro camadas, sendo o híbrido, composto por uma variação de duas a três camadas de esclerênquima. Esse anel de fibras, formado por células esclerenquimáticas, circundando o cilindro vascular, também foi encontrado por Vannucci (1982) em espécies de *Manihot* do Cerrado como a *M. caerulescens* e por outras espécies silvestres estudadas por Allem (1984) e Cunha Neto *et al.* (2014).

Células secretoras, em grupos ou isoladas, são características de Euphorbiaceae. Os acessos estudados apresentaram idioblastos secretores distribuídos por todo o córtex. Em *M. reflexifolia* foi possível observar idioblastos cristalíferos, em forma de drusas.

De acordo com Metcalfe (1983), a presença, ausência, distribuição e/ou frequência de idioblastos cristalíferos, não pode ser considerado um caráter de identificação tão importante, pois os mesmos podem variar de acordo com as condições do ambiente onde a planta se encontra.

O xilema e floema estão distribuídos em forma de arco bastante evidente em *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e nos híbridos. A grande variação que existe nessa região é em relação à quantidade de conjunto de feixes vasculares. *M. reflexifolia* apresentou entre sete e nove conjuntos de feixes e *M. reniformis* apresentou uma constância quanto ao número de feixes, sendo dez. Já o híbrido apresentou cortes histológicos com cinco, seis, sete e dez conjuntos de feixes vasculares.

Cunha Neto *et al.* (2014), que também realizaram estudos anatômicos com a *M. reflexifolia*, identificaram seis grupos de feixes vasculares diferente do apresentado nos resultados neste trabalho. Essa diferença pode sim estar associada às afirmações de Cunha Neto *et al.* (2014), Esau (1965) e Metcalfe (1983), de que existe uma inconstância nesse caracter para caracterização de espécies de *Manihot*. Esse caracter é alvo de grandes discussões, pois autores acreditam que essa variação pode esta relacionada ao ambiente ou a diferentes partes do pecíolo. Entretanto, diante dos resultados apresentado nesta pesquisa vemos que o ambiente não foi percussor dessas variações encontradas na quantidade de feixes vasculares, visto que *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e os híbridos foram coletados nas mesmas condições ambientais.

Folhas do tipo hipostomáticas foram encontradas em *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e nos híbridos, não havendo diferença nas espécies silvestres de *Manihot* estudadas por Vannucci (1982), Allem (1984) e Cunha Neto *et al.* (2014).

Não foi possível observar a tipologia dos estômatos devido à grande quantidade de papilas que cobrem a epiderme de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos híbridos. No entanto, estudos feitos por Allem (1984), caracterizando anatomicamente espécies do gênero *Manihot*, foi possível afirmar que a maioria do complexo estomático avaliados, é paracítico. O mesmo também foi encontrado na maioria das espécies avaliadas por Cunha Neto *et al.* (2014) em trabalhos com *Manihot* e por Vannucci (1982) em *M. papilosa*.

O mesofilo presente em *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e nos híbridos, foi do tipo isobilateral como já descrito para a família Euphorbiaceae Thakur (2012). A grande diferença entre eles foi à distribuição do formato, tamanho das células e quantidade de camadas de células que compõem o parênquima paliçádico. *M. reflexifolia* apresentou parênquima paliçádico bem organizado quanto ao tamanho e formato das células, o parênquima lacunoso com células um pouco irregular quanto ao tamanho e formato e com bastante espaços intercelulares.

A *M. reniformis* apresentou tanto o parênquima paliçádico, quanto o lacunoso bastante irregulares e com células bem esponjosas e frouxas. O híbrido apresentou uma mescla das duas composições dos mesofilos supracitados. A primeira camada do parênquima paliçádico apresentou células bem organizadas, sem muitos espaços intercelulares, já o parênquima lacunoso junto com a segunda camada do parênquima paliçádico, mostrou-se bastante irregular quanto ao formato e tamanho das células e com células bastante esponjosas.

Quanto ao número de camadas, caracter também usado por Vannucci (1982) para caracterizar suas espécies em estudo, *M. reniformis* e os híbridos apresentaram um maior número de camadas de células no parênquima paliçádico voltado para a face abaxial em relação a *M. reflexifolia*. Essa diferente quantidade de camadas de células que formam o parênquima paliçádico é comum em outros gêneros da família Euphorbiaceae, como por exemplo, em *Jatropha* (LEAL & AGRA 2005).

M. reflexifolia, *M. reniformis* e os híbridos, apresentaram feixe vascular no mesofilo do tipo colateral, o mesmo encontrado por Cunha Neto *et al.* (2014) e Vannucci (1982) ao analisarem espécies silvestres de *Manihot*, mostrando ser um caracter comum dentro do gênero, impossibilitando sua descrição taxonômica.

O formato da nervura se mostrou como uma importante característica anatômica para identificação do híbrido. *M. reflexifolia* apresentou formato da nervura biconvexa. Esse formato já foi identificado em espécies do gênero *Manihot* estudadas por Cunha Neto *et al.* (2014). *M. reniformis*, apresentou nervura proeminente, onde a curvatura abaxial é maior que a adaxial. Esse

mesmo formato foi encontrado em *M. violacea* subsp. *Jacobinensis*, investigada também por Cunha Neto *et al.* (2014). Esse formato pode estar associado à morfologia do pecíolo, pois ambas possuem pecíolo achatado dorsiventralmente. Já os híbridos apresentaram nos cortes em secção transversal, nervura com formato biconvexa e outros indivíduos que também possuem morfologia do pecíolo achatado dorsiventralmente, nervura proeminente.

A extensão da bainha é um caracter anatômico muito importante dentro do gênero *Manihot* para caracterização anatômica e identificações taxonômicas, como utilizado por Vannucci (1982), Allem (1984) e Cunha Neto *et al.* (2014) em seus estudos a partir desse caráter, que juntamente a outros, foi possível dividir as espécies silvestres estudadas em dois grupos taxonômicos. As análises das lâminas deste estudo, com *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e os híbridos, não foram diferentes. O primeiro táxon apresentou uma contínua extensão da bainha dos feixes, diferente da *M. reniformis* que é evidente a bainha, mas sua extensão não foi tão contínua. Já nos híbridos, a bainha é bastante evidente, porém sua extensão varia.

A identificação de células especializadas da epiderme em espécies da família Euphorbiaceae tem recebido destaque em trabalhos de cunho anatômicos, por exemplo, com *Jatropha* Leal & Agra (2005) e Melo *et al.* (2011); trabalhos de Allem (1984), Vannucci (1982), Cunha Neto *et al.* (2014) com *Manihot*; trabalhos também em outras famílias e gênero de angiospermas, por exemplo, com *Poaceae* de Jesus Júnior *et al.* (2012) e *Annonaceae* de Almeida *et al.* (2009), identificação de papilas e tricomas. Sendo assim, para este estudo, a identificação de papilas foi uma característica bastante explorada. *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e os híbridos apresentaram papilas por toda área abaxial da epiderme, tendo um formato com base globular e a parte superior alongada, sendo que no híbrido, essas papilas estavam pouco desenvolvidas e mais aglomeradas quando comparadas às outras duas espécies.

Conclusão

Com toda importância da anatomia vegetal para identificação e caracterização de espécies, sabe-se que a mesma deve estar atrelada a outras tecnologias, como exemplo da citogenética e biologia molecular, para responder alguns tipos de hipóteses. Entretanto, a mesma mostrou-se eficiente para caracterizar *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e os híbridos e identificar os dois primeiros táxons silvestres como parentais dos híbridos (*M. reflexifolia* x *M. reniformis*), a partir de caracteres anatômicos importantes como: a morfologia do pecíolo e da nervura central, a extensão da bainha dos feixes, a organização e quantidade de grupos de feixes vasculares, a organização e composição do mesofilo, e a presença de papilas epidérmicas.

Referências

Almeida, E F. D.; Potiguara, R. C. V.; Macedo, E.G.; Lins, A. L. F. A. Anatomia foliar de espécies de *Xylopia* L. (Annonaceae) ocorrentes no Parque Ecológico de Gunma, Santa Bárbara, estado do Pará. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais, v. 4, p.175-194, 2009.

Allem, A. C. A revision of *Manihot* section *Quinquelobae* (Euphorbiaceae). Thesis, Department of Botany, University of Reading, 1984.

Balsamo R.A.; Bauer A.M.; Davis S.D.; Rice B.M. Leaf biomechanics, morphology, and anatomy of the deciduous mesophyte *Prunus serrulata* (Rosaceae) and the evergreen sclerophyllous shrub *Heteromeles arbutifolia* (Rosaceae). American Journal of Botany, v. 90, p. 72–77, 2003.

Cunha Neto. I. L. D.; Martins. F. M.; Caiafa. A. N.; Martins. M. L. L. Leaf anatomy as subsidy to the taxonomy of wild *Manihot* species in *Quinquelobae* section (Euphorbiaceae). Brazilian Journal of Botany, v. 37, p. 481-494, 2014.

Esau, K. Plant anatomy. John Wiley & Sons, 2^aed, 1965.

Esau, K. Anatomia Vegetal. Omega S/A, 2ªed, 1977.

Dickison W.C. Integrative plant anatomy. Academic Press,2000.

Jesus Júnior, L. A.; Oliveira, R. P.; Leite, K. R. B.; Silva, L. B. Comparative analysis of the leaf anatomy in two *Parodiolyra* species (Poaceae: Olyreae) occurring on forests in Eastern Brazil. Brazilian Journal of Biology, v.72, p.205-210, 2012.

Leal. C.K.A.; Agra M. de F. Estudo Farmacobotânico Comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill. e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae). Acta farmacéutica bonaerense, v. 24, p. 5-13, 2005.

Mendonça, M. S. Estudo de plantas laticíferas. II Aspectos anatômicos e distribuição de vasos laticíferos em *Manihot glaziovii* Muller. Acta Amazonica, v. 22, p.309 – 321, 1992.

Melo. G. M. de.; Cunha. P. C.; Pereira. J. A. F.; Willadino. L.; Ulisses. C. Alterações anatômicas em folhas e raízes de *Jatropha curcas* L. cultivadas sob estresse salino. Revista Ciência Agronômica, v.42, 2011.

Metcalf, C. R. Ecological anatomy and morphology general survey. In: Metcalf, C. R. & Chalk, L. Anatomy of the Dicotyledons, 2ª Ed, Oxford: Clarendon Press, 1983.

Nassar, N. M. A.; Hashimoto, D. Y.; Fernandes, S. D. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. Genetic Molecular, v. 7, p. 16-28, 2008.

Piwczynski. M., Ponikierska. A., Puchałka. R., Corral. J.M. Expression of anatomical leaf traits in homoploid hybrids between deciduous and evergreen species of *Vaccinium*. Plant Biology, v.15, p. 522–530, 2013.

Rudall, P. Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): Homology and Evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 81, p.270-282, 1994.

Rogers, D. J.; Appan, S.G. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): A Computer Assisted Study. *Flora Neotropica. Monograph*. Hafner Press, New York, 1973.

Scareli-Santos C.; Herrera-Arroyo M.L.; Sanchez-Mondrago M.L.; Gonzalez - Rodriguez A.; Bacon J., Oyama K. Comparative analysis of micro-morphological characters in two distantly related Mexican oaks, *Quercus konzattii* and *Quercus eduardii* (*Fagaceae*), and their hybrids. *Brittonia*, v. 59, p. 37–48, 2007.

Thakur, H. A.; Patil, D. A. The family Euphorbiaceae: Anatomical conspectus. *World Journal Science Techn*, v. 2, p. 51-57, 2012.

Vannucci, A. L. Anatomia Comparada de Duas Espécies Nativas de *Manihot Mill.* (Euphorbiaceae). Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1982.

Viegas, A.P. Anatomia da parte vegetativa da mandioca. *Boletim Técnico. Instituto Agrônômico de Campinas*, v. 74 p. 1-30, 1940.

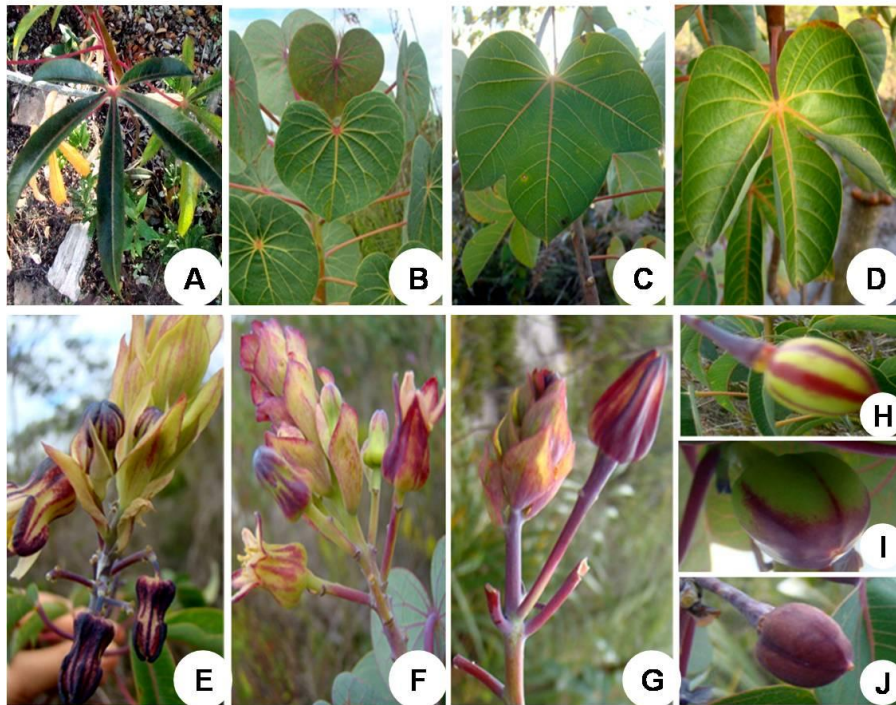


Figura 1 (A – J): Aspectos morfológicos de *M. reflexifolia*; *M. reniformis* e os prováveis híbridos. A - Folha de *M. reflexifolia*; B - Folha de *M. reniformis*; C e D – Folha de indivíduo híbrido. E, F e G- Inflorescência de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e do híbrido respectivamente. H – Fruto da *M. reflexifolia*; I – Fruto de *M. reniformis* e J – Fruto do híbrido.

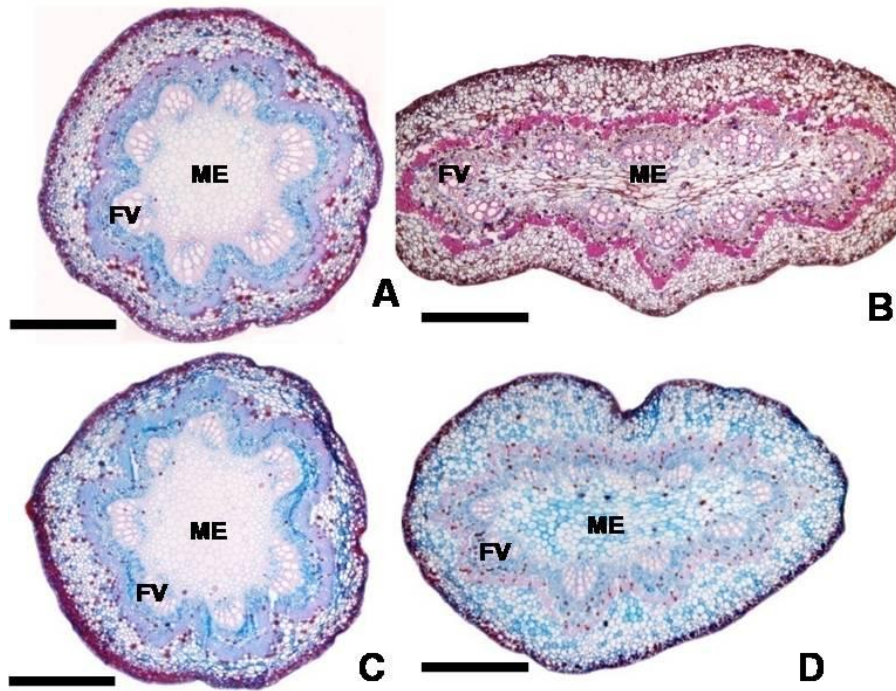


Figura 2 (A – D): Secção transversal do pecíolo. A – Pecíolo cilíndrico de *M. reflexifolia*; B – Pecíolo de *M. reniformis* com morfologia achatado dorsiventralmente; C e D – Corte do pecíolo dos prováveis híbridos, cilíndrico e achatado dorsiventralmente, respectivamente. FV: Feixe vascular; ME: Medula. Escala da barra = 150µl.

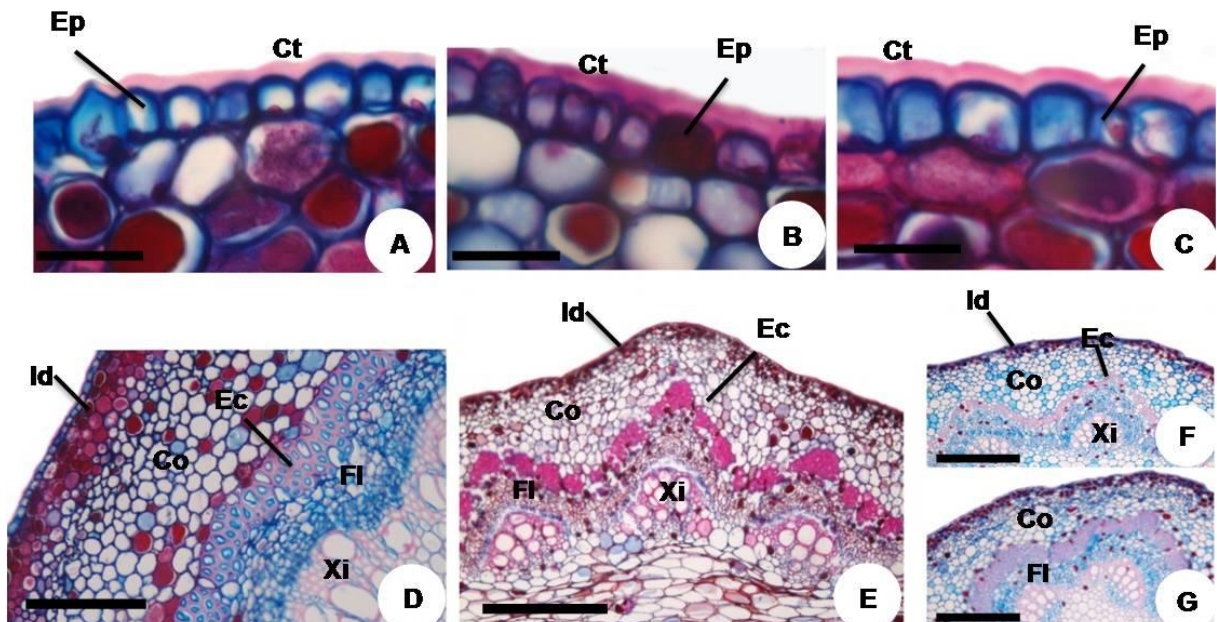


Figura 3 (A –G): Detalhes do pecíolo em corte transversal. A e D – *M. reflexifolia*; B e E – *M. reniformis*; C, F e G – Híbrido. Ep: Epiderme; Ct: Cutícula; Id: Idioblastos; Co: Côtex; Ec: Esclerênquima; Fl: Floema; Xi: Xilema. Escala da barra: A – C = 40 µl; D – G = 30 µl.

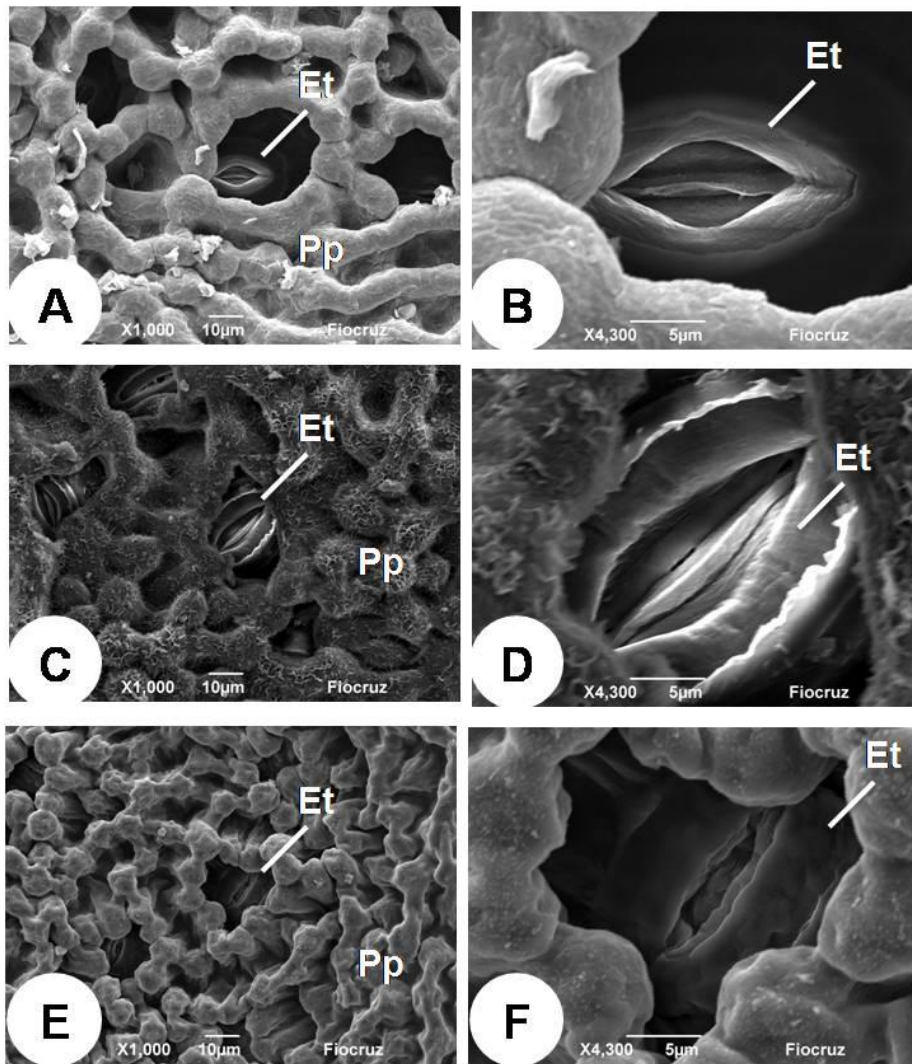


Figura 4 (A – F): Vista frontal das células epidêmicas via microscopia de varredura. A e B – *M. reflexifolia*; C e D – *M. reniformis*; E e F – Híbridos. Et: Estômatos; Pp: Papilas.

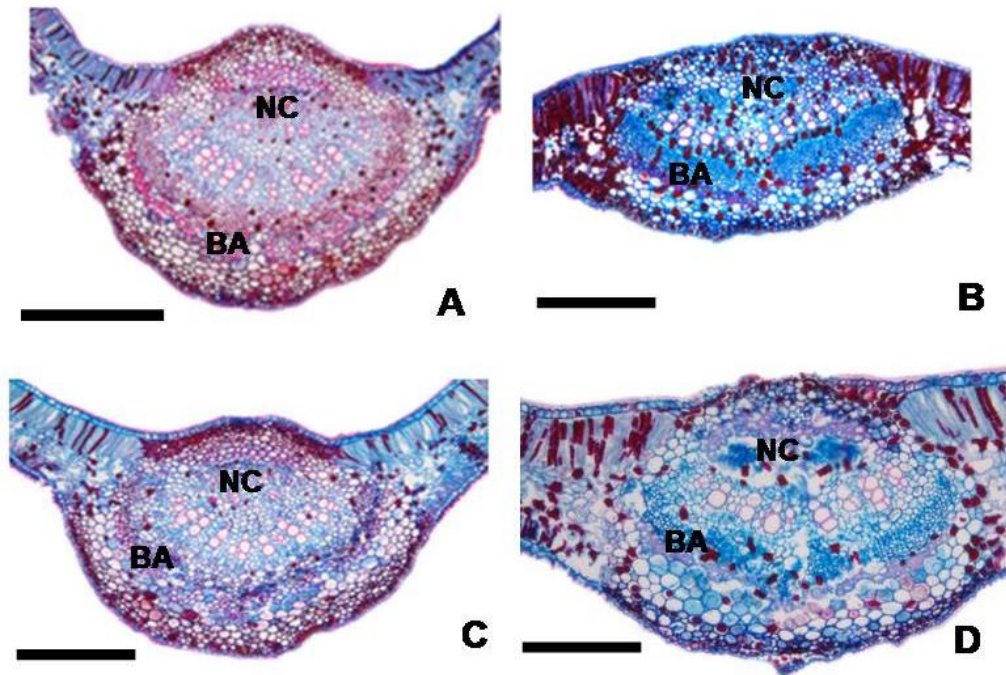


Figura 5 (A – D): Secção transversal das lâminas foliares. A à D: Visão geral do formato da nervura central de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos híbridos, respectivamente. NC: Nervura Central; BA: Bainha Escala da barra =60 µl.

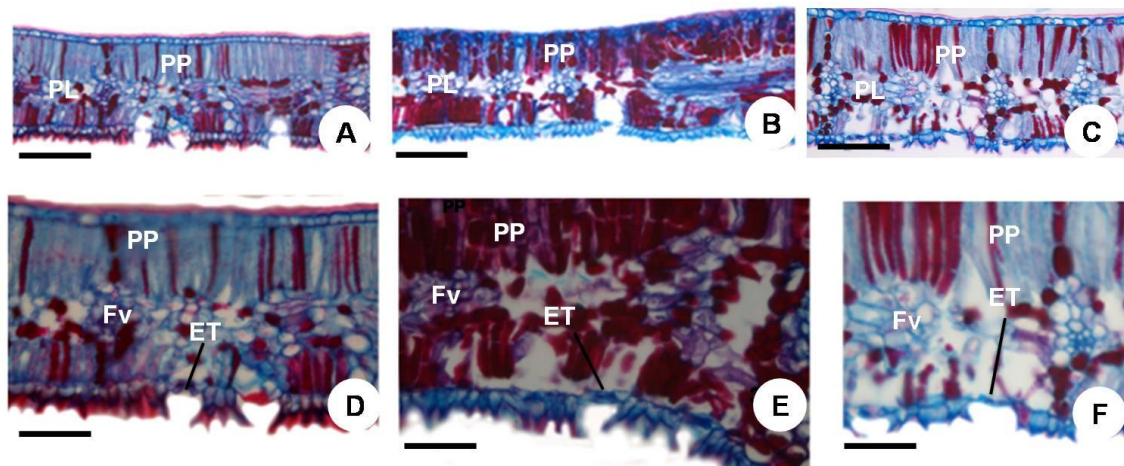


Figura 6 (A –F): Secção transversal das lâminas foliares. A a F – Detalhes do mesofilo. A e D – *M. reflexifolia*; B e E – *M. reniformis*; C e F – Híbridos. PP: Parênquima paliçádico; PL: Parênquima Lacunoso; Et: Estômatos; Fv: Feixe vascular. Escala da barra: A – C = 60 µl; D – F = 30 µl.

CAPÍTULO II

BIOLOGIA MOLECULAR E CITOGÉNÉTICA COMO FERRAMENTAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDO NATURAL ENTRE *M. reniformis* Pohl e *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins

² O artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico *Annals of Botany*.

BIOLOGIA MOLECULAR E CITOGENÉTICA COMO FERRAMENTAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDO NATURAL ENTRE *M. reniformis* Pohl e *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins

Resumo: O objetivo desse trabalho foi utilizar técnicas da Biologia Molecular e Citogenética para identificar as espécies silvestres, *M. reniformis* e *M. reflexifolia*, como progenitoras de supostos híbridos naturais localizados no Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM) - Projeto Sempre Viva, na cidade de Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia. Material vegetal de 50 indivíduos foram coletados, sendo 21 indivíduos *M. reflexifolia*, 14 *M. reniformis* e 15 dos supostos híbridos, para a execução das técnicas. Folhas jovens foram utilizadas para extrair e amplificar o DNA desses indivíduos. 23 primers SSR (*Simple Sequence Repeats*) foram amplificados via PCR. As análises moleculares foram feitas com base fragmentos e no padrão de banda, dos possíveis híbridos e dos parentais. A matriz de dissimilaridade genética entre os indivíduos foi gerada, sendo calculada com base no índice de Dice para os dados co-dominantes, utilizando-se o programa Power Marker. Para o uso das técnicas citogenéticas, GISH, CMA/DAPI e viabilidade polínica, foram utilizadas como materiais vegetais, as raízes e os botões florais. As pontas das raízes e os botões coletados foram pré-tratados. O preparo das lâminas com células mitóticas, retirada das pontas das raízes, seguiu o protocolo proposto por Carvalho e Saraiva (1993). O protocolo de Heslop-Harrison *et al.* (1991) foi utilizado para a GISH. Para a coloração com fluorocromos, foi adotada a metodologia de Schweizer e Ambros (1994). O corante de Alexander foi utilizado no teste de viabilidade polínica. Os primers utilizados mostraram-se eficientes quanto a discriminabilidade das espécies *M. reniformis* e *M. reflexifolia*, identificando a partir do padrão de bandas, suas progênies. Sendo este o primeiro trabalho a utilizar GISH no gênero *Manihot*, a técnica foi eficiente na identificação dos híbridos junto aos seus progenitores. A técnica CMA/DAPI também foi eficiente na identificação dos híbridos, confirmando os resultados da GISH. Os grãos de pólen analisados, apresentam grande nível de viabilidade para os indivíduos analisados, confirmando a potencialidade para cruzamentos.

Palavras – chave: CMA/DAPI; GISH; hibridação natural; SSR.

MOLECULAR BIOLOGY AND CITOGENETICS AS TOOLS IN THE IDENTIFICATION OF NATURAL HYBRIDS BETWEEN *M. reniformis* Pohl and *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins

Abstract: The objective of the present work was to use molecular biology and cytogenetic techniques to identify the wild species *M. reniformis* and *M. reflexifolia*, as possible progenitors of the natural hybrids located in the Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM) - Sempre Viva project, in the city of Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia. Plant material of 50 individuals was collected, whereas 21 were *M. reflexifolia*, 14 *M. reniformis* and 15 of the possible hybrids. Young leaves were used to extract and amplify DNA of these individuals. 23 SSR (*Simple Sequence Repeats*) primers were amplified via PCR. The molecular analysis was carried out based on the size of base pairs (pb) of each fragment and the electrophoretic profile of the possible hybrids and progenitors. The dissimilarity matrix between the genotypes was calculated using the Dice indice for the co-dominant data by the PowerMarker software. For the cytogenetic techniques, GISH, CMA/DAPI and pollen grain viability, roots and flower buds were used as plant material. Root tips and flower buds were previously treated. Preparation of the slides with mitotic cells and removal of root tips, followed the protocol suggested by Carvalho and Saraiva (1993). The protocol by Heslop-Harrison *et al.* (1991) was used for GISH. For staining via fluorochromes, the methodology by Schweizer and Ambros (1994), was used. The Alexander dye was used to test pollen grain viability. The primers used were efficient to discriminate the *M. reniformis* and *M. reflexifolia* species, identifying the possible progenies via electrophoretic profiles. Since this is the first work using GISH in the *Manihot* genus, this technique was efficient in the identification of the hybrids among their progenitors. The CMA/DAPI technique was also efficient in the identification of hybrids, confirming the results from GISH. The pollen grains analyzed showed a high level of viability for the genotypes in this work, confirming potential for crosses.

Key-words: CMA/DAPI; GISH; natural crosses, SSR

Introdução

Espécies silvestres do gênero *Manihot* estão distribuídas por toda Região Neotropical. Segundo Rogers e Appan (1973), das 98 espécies já identificadas, cerca de 80% delas ocorrem no Brasil. O gênero possui fracas barreiras de isolamento reprodutivo entre as espécies, facilitando assim a ocorrência de hibridação interespecífica natural ou artificial (NASSAR 2000). As espécies silvestres são consideradas importantes fontes de alelos competitivos para transferência horizontal para a espécie cultivada *M. esculenta* Crantz (Mandioca).

Citogeneticamente, o gênero *Manihot* possui um cariótipo estável, com número cromossômico diplóide $2n = 36$ e haplóide $n = 18$ para todas as espécies já estudadas (CARVALHO & GUERRA, 2002; CARVALHO *et al.*, 1999; NASSAR, 2006; NASSAR *et al.*, 1995; UMANA & HARTMANN, 1973), sendo o gênero considerado, por muitos autores, de origem alotetraplóide, tendo como número básico $x = 9$. A origem alotetraplóide não foi confirmada até o momento, e trata-se de uma suposição. Um ponto contrário à possível origem tetraplóide é a ocorrência de uma meiose estável com formação de 18 bivalentes em metafase-anáfase I. Contudo, acredita-se que as espécies que deram origem ao gênero tenham sofrido processos de diploidização, via translocações, ao longo da evolução, apresentando atualmente, comportamentos cromossômicos típicos de espécies diploides (SILVA, 2011).

Segundo Carvalho *et al.* (2009) a análise cariotípica em células meióticas ou mitóticas, possibilita a identificação do polimorfismo cromossômico numérico ou estrutural entre os cariótipos e a descrição da homologia cariotípica em cultivares ou espécies silvestres, fornecendo informações importantes como alterações cromossômicas, taxa de fertilidade e percentual dos genomas parentais nos híbridos, informações importantes para os programas de melhoramento e que contribuem para a pré-seleção de linhagens progenitoras. A direção e a facilidade com que duas espécies podem ser cruzadas, o número e morfologia cromossômica e o comportamento dos cromossomos durante a meiose de genitores são considerados importantes

critérios para a avaliação do grau de proximidade genética entre espécies e acessos.

Sendo assim, a indicação de parentais favoráveis a hibridações ou identificação de materiais híbridos, pode ser auxiliada pelo uso de técnicas citogenéticas como a Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH). Essa técnica auxilia na identificação de marcadores cromossômicos ou diferenças na constituição genômica que permitam a distinção entre as espécies do gênero.

A FISH tem sido aplicada recentemente no mapeamento físico de sequências e na caracterização de espécies vegetais (UHRIN *et al.* 2011; YOUNIS *et al.* 2015). Esta técnica permite a localização *in situ* de sequências de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) no cromossomo, no citoplasma, nas organelas ou no tecido estudado (GUERRA, 2004). A mesma permite localizar sequências de cópia única, sequências repetitivas, cromossomos específicos ou genomas inteiros. A Hibridização genômica *in situ* (GISH) é uma variante da FISH desenvolvida para estudos de híbridos interespecíficos e identificação de genomas parentais. Silva (2011) e Melo *et al.* (2015) realizaram estudos de identificação de híbridos em *Jatropha* e *Passiflora* respectivamente, a partir da GISH. Outra técnica de bandeamento bastante utilizada, é a que faz uso de corantes fluorescentes base-específicos. Alguns corantes fluorescentes possuem propriedades específicas de ligação a determinadas bases nos ácidos nucleicos. Podem ser encontrados fluorocromos com afinidade pelas bases adenina timina (AT), como é o caso do 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), da quinacrina e do Hoechst 33258, e outros que coram as regiões ricas em guanina e citosina (CG), destacando-se a cromomicina A₃ (CMA) e a mitramicina.

O DAPI e o CMA são os mais empregados no estudo de cromossomos de plantas (SUMNER, 2003; KIM *et al.*, 2002). Carvalho e Guerra (2002) observaram padrões de bandas semelhantes entre cultivares e espécies de *Manihot* ao utilizarem os corantes CMA/DAPI, sugerindo alta estabilidade cariotípica do gênero. Os mesmos tipos de corantes foram aplicados em espécies de *Citrus* L (*Rutaceae*) por Carvalho *et al.* (2005). Essas espécies foram caracterizadas e diferenciadas através do padrão de bandas e quantidade de heterocromatina CG ou AT positiva. Embora o gênero

apresentasse estabilidade numérica $2n = 18$, a técnica de CMA/DAPI foi eficiente para demonstrar padrões espécie-específicos e heterozigidade entre os pares de homólogos.

Outra técnica bastante utilizada, são os marcadores de DNA. Esses marcadores moleculares podem gerar informações sobre identidade genética, freqüências de genes, classificação botânica, diversidade, filogenia e paternidade de genótipos (VIEIRA *et al.* 2013), permitindo uma avaliação em curto prazo de um grande número de indivíduos sem a influência do ambiente.

O uso de marcadores moleculares dentro do gênero *Manihot* tem aumentado nos últimos anos devido à grande quantidade de informações disponíveis sobre o genoma das espécies (COLOMBO *et al.* 2000, CARVALHO & SCHAAL 2001, MBA *et al.* 2001, ELIAS *et al.* 2004, OLSEN 2002 e VIEIRA *et al.* 2013).

Marcadores como o SSR (*Simple Sequence Repeats*), são importantes ferramentas para identificação de espécies e estudos de paternidade de híbridos (WEILER *et al.* 2009, SCHUCK *et al.* 2011, VIEIRA *et al.* 2013), devido à sua natureza co-dominante, serem altamente polimórficos, de fácil reprodução, e possuírem alta resolução e transferabilidade e repetibilidade mediante ampliações via PCR (Polymerase Chain Reaction) (GAO *et al.* 2003, GAUDEUL *et al.* 2004, OLIVEIRA *et al.* 2006). Esses marcadores também permitem a obtenção de dados de forma mais robusta e precisa.

O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar possíveis híbridos interespecíficos naturais entre *M. reniformis* Pohl e *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins, e seus progenitores silvestres endêmicos da região da Chapada Diamantina, Bahia, com o uso de marcadores microssatélites (SSR) e das técnicas de CMA/DAPI e Hibridização Genômica *in situ* (GISH).

Materiais e Métodos

Material vegetal:

Todo material necessário para a realização desse estudo foi coletado no ambiente natural das espécies. Tecidos vegetais de folhas jovens, botões florais e pontas de raízes das espécies silvestres, *M. reniformis* Pohl e *M. reflexifolia* P. Carvalho & M. Martins e dos possíveis híbridos, foram coletados no Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM)-Projeto Sempre Viva, localizado na cidade de Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Partes das plantas em fase reprodutiva foram coletadas para montagem das exsiccatas as quais estão depositadas no Herbário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (HURB).

Extração e amplificação de DNA:

Folhas jovens foram coletadas de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos possíveis híbridos no Parque Sempre Viva para extração do DNA. A extração do DNA seguiu o protocolo Doyle & Doyle (1987), sendo realizada no Núcleo de Biologia Avançada (NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA.

A avaliação da quantidade e da qualidade do DNA foi realizada pela análise comparativa das amostras em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, e as amostras diluídas em água ultrapura e padronizadas para uma concentração final de 20 ng μ L.

As amostras de amplificação dos marcadores SSR via PCR, foram completadas para o volume final de 15 μ L contendo os seguintes reagentes: 20 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 3.0 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de dNTP, 0,15 mM de cada iniciador, 1U da Taq DNA Polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador da *Applied Biosystems* com o seguinte programa de amplificação: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min.; 30 ciclos a 94 °C por 40s, 60°C por 40s (temperatura que variou de acordo com a temperatura de anelamento (T_a) de cada primer), 72 °C por 1min.; extensão final a 72 °C por 7min. e 10 °C ∞ .

Foram utilizados vinte e três iniciadores SSR (MBA *et al.*, 2001) (Tabela 1). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 3% e corados com brometo de etídeo, visualizados sob luz UV, e fotografados em sistema fotodocumentação (Vilber Lourmat). O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen™).

Tabela 1: Iniciadores Microssatélites com os nomes, pares de bases dos fragmentos, as sequências dos primers forward (F) e reverse (R) e temperaturas de anelamento.

Iniciadores SSR	Pb	Sequência Forward (5´-3´)	Sequência Reverse (5´-3´)	Ta (°C)*
SSRY 12	266	AACTGTCAAACCATTCTACTTGC	GCCAGCAAGGTTTGCTACAT	55
SSRY 27	277	CCATGATTGTTTAAGTGGCG	CCATTGGAGAACTTGGCAAC	55
SSRY 28	180	TTGACATGAGTGATATTTTCTTGAG	GCTGCGTGCAAAACTAAAAT	55
SSRY 31	188	CTTCATCACGTGTTAATACCAATC	ATTGTTGTGGTTGCAGGACA	55
SSRY 49	300	TGAAAATCTCACTGGCATTATTT	TGCAACCATAGTGCCAAGC	55
SSRY 68	287	GCTGCAGAATTTGAAAGATGG	CAGCTGGAGGACCAAAAATG	55
SSRY 72	141	AAGCATCAGTGGCTATCAACA	TTTTGCTGTGCTATTTCTGAGC	55
SSRY 75	284	TCTGGTAAACCTACTAGTGCTCCA	TTCATGCACGTCTGATACA	55
SSRY 77	275	CAGGAGGTGGCAGATTTTGT	GCATGTTCCACCTGCATAAG	55
SSRY 81	204	GGCGATTTTCATGTCATGCTT	TGATTTTCTGCGTGATGAGC	55
SSRY 82	211	TGTGACAATTTTCAGATAGCTTCA	CACCATCGGCATTAAACTTTG	55
SSRY 93	289	TTTGTGCTCACATGAAAACG	CAGATTTCTTGTGGTGCCTG	55
SSRY 101	213	GGAGAATACCACCGACAGGA	ACAGCAGCAATCACCATTTC	55
SSRY 103	272	TTGGCTGCTTTCACTAATGC	TTGAACACGTTGAACAACCA	55
SSRY 105	225	CAAACATCTGCACTTTTGGC	TCGAGTGGCTTCTGGTCTTC	55
SSRY 106	270	GGAAACTGCTTGACAAAGA	CAGCAAGACCATCACCAGTTT	55
SSRY 143	153	GCTCATGAACTGAGCCTTCA	AGCAGATCCAATCACTGAAA	55
SSRY 168	277	ACAGCCACACTTGTCTCCA	CTGCAATCTCCAACAGCAAC	45
SSRY 170	299	TCTCGATTTGGTTTGGTTCA	TCATCCTTGTGTCAGCGTTA	55
SSRY 175	136	TGACTAGCAGACACGGTTTCA	GCTAACAGTCCAATAACGATAAGG	55
SSRY 179	226	CAGGCTCAGGTGAAGTAAAGG	GCGAAAGTAACTTACAACCTTTCTAA	55
SSRY 180	163	CCTTGGCAGAGATGAATTAGAG	GGGGCATTCTACATGATCAATAA	55
SSRY 182	253	GGAATTCCTTGTATATGATGCC	TTCTTTACAATTCTGGACGC	55

*Ta: Temperatura de anelamento (°C) que variou de acordo com a sequência de cada primer.

Análise molecular:

As análises dos dados foram feitas a partir dos perfis eletroforéticos em gel de agarose por meio da comparação dos padrões dos fragmentos dos híbridos e dos parentais. A partir da genotipagem dos fragmentos com base no seu tamanho em pares de bases (pb), em comparação com padrão de peso molecular *ladder* 100 pb, foi construída a matriz de dissimilaridade genética entre os indivíduos, sendo calculada com base no índice de Dice para os dados co-dominantes, utilizando-se o programa Power Marker (LIU & MUSE, 2005).

A matriz de distância genética foi utilizada como base para a construção do dendrograma, em que o agrupamento foi calculado utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, por meio do software MEGA – 4 (TAMURA *et al.* 2007).

Análise citogenética:

Coleta de material

Foram coletadas pontas de raízes recém emergidas, via alporquia. O método da alporquia foi escolhido, devido ao fato das espécies silvestres apresentarem resistência à reprodução vegetativa pelo enraizamento por estaquia ou manivas. As alporquias foram feitas em dez indivíduos de *M. reniformis*, *M. reflexifolia* e dos prováveis híbridos no Parque Municipal Natural de Mucugê (PMNM)-Projeto Sempre Viva, localizado na cidade de Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Após 45 dias foi possível obter raízes adequadas para as análises citogenéticas. Foram também coletados botões florais para estudos da viabilidade polínica.

Pré - tratamento e fixação

As pontas das raízes coletadas foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 2 mM por 4 h e 30 min, a 18 °C, fixadas em metanol: ácido acético (3:1) e estocadas a – 20 °C. As raízes armazenadas em fixador foram retiradas e inicialmente lavadas duas vezes em água destilada por 5 min. cada e digeridas com solução enzimática com celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (Sigma) em câmara úmida a 37 °C por 2h. Após a digestão, os materiais foram lavados com água destilada antes do preparo das lâminas.

Preparo das lâminas dos híbridos

O preparo das lâminas com células mitóticas seguiu o protocolo proposto por Carvalho e Saraiva (1993). Foi gotejado nas lâminas o fixador (metanol: ácido acético, 3:1) gelado (- 20 °C) recém-preparado. As pontas das raízes foram colocadas em lâminas inclinadas, lavadas com fixador e maceradas. Posteriormente, as lâminas foram secas com bomba de ar,

mergulhadas em ácido acético 45% por 12s e secas à temperatura de 50 °C. As melhores lâminas foram selecionadas mediante coloração com uma mistura de DAPI com glicerol (1:1 v/v). Em seguida, as lâminas passaram por descoloração em fixador Carnoy (etanol e ácido acético, 3:1) por 30 min., imersão em álcool etílico absoluto por 1 h a temperatura ambiente, secas ao ar e estocadas a -20 °C até o momento de sua utilização.

O preparo das lâminas para a realização da GISH iniciou-se pela escolha do DNA genômico de um dos parentais como bloqueio e como sonda. A extração do DNA seguiu o protocolo Doyle & Doyle (1987) com modificações. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1%. Para o preparo das sondas, amostras de DNA genômico de *M. reniformis*, e *M. reflexifolia* foram marcadas por nick translation (Roche Diagnostics, Life Technologies), com digoxigenina-11-dUTP (Roche). Para o preparo do DNA bloqueio de *M. reniformis* Pohl, o DNA extraído também foi fragmentado em autoclave em tamanhos na faixa de 200 a 500 pb e posteriormente ressuspendido em água Mili-Q.

Hibridização genômica

A Hibridização genômica *in situ* (GISH), seguiu o protocolo de Heslop-Harrison *et al.* (1991).

As lâminas utilizadas foram preparadas com células meristemáticas dos supostos híbridos e as sondas aplicadas sobre as células, preparadas a partir do DNA genômico dos parentais. Foi necessária a utilização do DNA denominado de bloqueador (DNA dos parentais sem a marcação com CY3). Testes foram realizados para determinar a proporção do DNA bloqueador em relação à sonda na mistura de hibridização. Para cada provável híbrido, foram testados diferentes proporções do DNA bloqueador dos respectivos parentais para evitar a coloração uniforme de todos os cromossomos nas células do híbrido. A melhor proporção de DNA bloqueador em relação à sonda foi de 1:40.

Coloração com fluorocromos CMA/DAPI

Para a coloração com fluorocromos, foi adotada a metodologia de Schweizer e Ambros (1994). As raízes de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos supostos híbridos, foram digeridas por 2 horas em uma solução de celulase (2%) e pectinase (20%) a 37°C e, posteriormente, esmagadas em ácido acético a 45%. As lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e, posteriormente, coradas com CMA a 0,5 mg/mL, por 60 minutos e novamente coradas com DAPI 2 g/ml por 30 minutos e, finalmente, montadas em tampão McIlvaine-glicerol 1:1 (v/v).

Viabilidade Polínica

Para as análises de viabilidade polínica, botões florais jovens de *M. reniformis*, *M. reflexifolia* e dos supostos híbridos foram fixados em Carnoy (metanol: ácido acético (3:1)). Após a fixação, esses foram cortados transversalmente e os grãos de pólen cuidadosamente extraídos. Foi utilizado para coloração, o corante de Alexander (Alexander, 1980), adicionando-se uma gota do corante em cada lâmina. Foram considerados viáveis os grãos de pólen que apresentaram coloração avermelhada e inviáveis os de coloração azulada.

Coloração convencional

Para a coloração convencional, foram utilizadas raízes jovens de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos prováveis híbridos pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína por 4 horas a temperatura ambiente, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por um período de 24 horas, e estocadas no freezer até posterior análise. As lâminas foram preparadas pela técnica do esmagamento em uma gota de ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula e coradas com Giemsa 2% (GUERRA e SOUZA 2002).

Captura e processamento das imagens

As imagens das melhores células foram digitalizadas em câmera Leica DFC 340FX acoplada ao microscópio de epifluorescência Leica por meio do software Leica CW 4000. As imagens foram otimizadas para melhor brilho e

contraste com o software Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated).

Resultado e Discussão

Análise molecular

Dos 23 primers SSR testados nos 50 indivíduos deste estudo, nove apresentaram um bom padrão de amplificação para a maioria dos acessos de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos supostos híbridos analisados, sendo eles: SSRY 182, SSRY 77, SSRY 106, SSRY 168, SSRY 103, SSRY 12, SSRY 81, SSRY 179, SSRY 143 (Figura 1). Estudos recentes relacionados à identificação de parentais de híbridos interespecíficos do gênero *Manihot*, utilizaram iniciadores microssatélites, alguns presentes neste trabalho, e obtiveram excelentes resultados quanto à eficácia do SSRY para a identificação dos híbridos e seus parentais (VIEIRA *et. al.* 2013). Outros estudos sobre teste de paternidade em espécies de vegetais, utilizaram menores combinações de primers microssatélites, sendo os mesmo eficientes na identificação do parental dos genótipos (CRISTOFANI *et. al.* 2001; WEILER *et.al.* 2009).

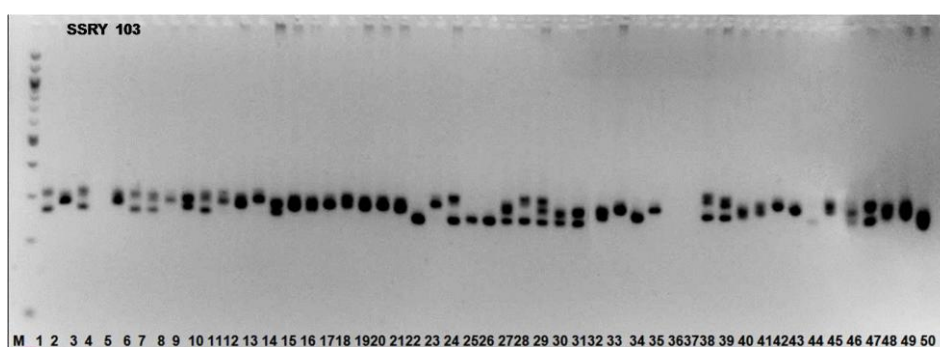


Figura 1: Perfil eletroforético em gel de agarose 3% ilustrando o padrão de amplificação do primer SSR 103 nos 50 indivíduos coletados (1 – 50). M - Marcador molecular 100pb; 1-21 *Manihot reflexifolia*, 22-35 *Manihot reniformis* e 36-50 prováveis híbridos.

Os iniciadores utilizados neste trabalho foram desenvolvidos para espécies cultivadas de mandioca, o que pode explicar o baixo índice de amplificação dentro do total de primers selecionados. Apesar de apenas nove

primers microssatélites se mostrarem polimórficos, a sua transferibilidade em espécies silvestres foi satisfatória. Márquez- Lema *et. al.* (2010) afirma que essa característica dos iniciadores microssatélites entre espécies do mesmo gênero, é possível, pois as sequências de nucleotídeos das regiões flangeadoras são homólogas.

Dos 50 indivíduos foram selecionados 28, sete *M. reflexifolia*, seis *M. reniformis* e todos os supostos híbridos envolvidos no presente trabalho, que tiveram suas bandas amplificadas em todos os nove iniciadores microssatélites. Com isso foi possível observar de forma individual, os possíveis parentais de alguns híbridos com os marcadores microssatélites mais precisamente, o primer SSRY 182 e 103 (Figura 2 e 3).

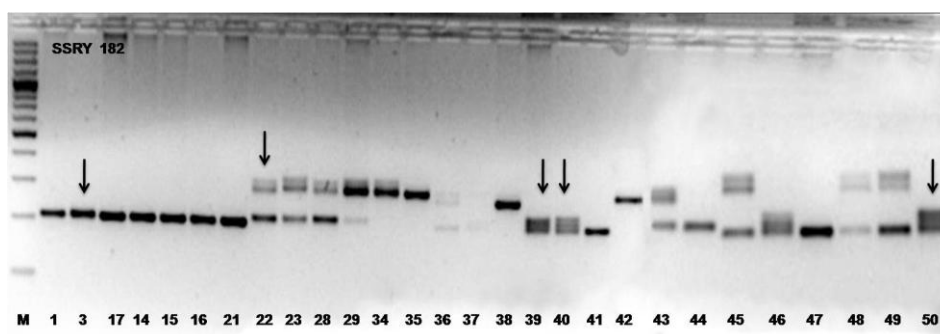


Figura 2: Amplificação do primer SSRY 182 evidenciando os possíveis pais de alguns híbridos. M - Marcador de peso molecular 100pb; *M. reflexifolia* (1; 3; 17; 14; 15; 16; 21), *M. reniformis* (22; 23; 28; 29; 34; 35) e os híbridos (36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46;47;48;49;50). As setas indicam os padrões de bandas compartilhados entre os prováveis parentais e os híbridos indicados.

Segundo Faleiro *et. al.* (2003) a utilização de um ou dois iniciadores de síntese ou de combinações de iniciadores, com pelo menos uma banda informativa é suficiente para confirmar a ocorrência, ou não, de fecundação cruzada. Borém (1997) afirma que, cada banda informativa funciona normalmente como um gene marcador para os melhoristas que objetivam realizar testes de paternidade. Na figura 2, estão em destaque as bandas correspondentes aos indivíduos 3 (*M. reflexifolia*) e 22 (*M. reniformis*) que provavelmente originaram os híbridos 39, 40 e 50 que estão também em destaque. Isso é possível observar a partir do padrão de bandas apresentadas pelos pais, *M. reflexifolia* e *M. reniformis*, presentes nos híbridos.

Na figura 3, através da amplificação do primer SSRY 103 é possível observar, a partir dos padrões de bandas amplificadas, mais um conjunto de híbridos originados diretamente dos parentais em destaque. O indivíduo 1 (*M. reflexifolia*) junto com o 23 (*M. reniformis*), são os possíveis pais dos híbridos 38, 44, 47, por apresentarem os mesmos padrões de bandas dos pais supracitados. Santos *et al.* (2012) identificou híbridos de *Passiflora* com base em marcadores microssatélites, a partir da análise das bandas informativas presentes no gel, afirmando ser uma metodologia de sucesso para identificar hibridação.

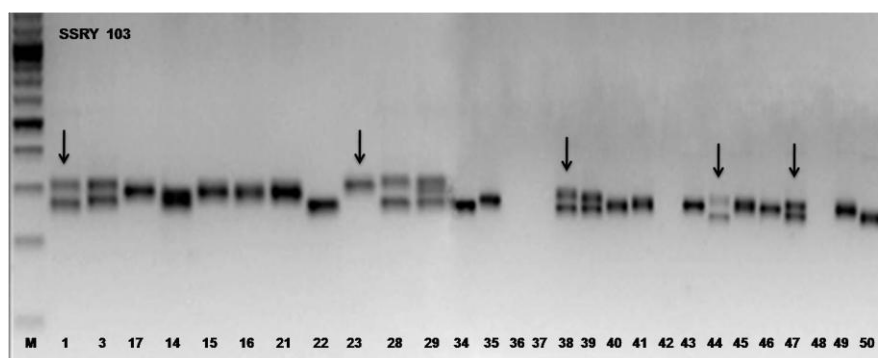


Figura 3: Amplificação do primer SSRY 103 evidenciando os possíveis pais de alguns híbridos. M: Marcador de peso molecular 100pb; *M. reflexifolia* (1; 3; 17; 14; 15; 16; 21), *M. reniformis* (22; 23; 28; 29; 34; 35) e os híbridos (36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46;47;48;49;50). As setas indicam os padrões de bandas compartilhados entre os prováveis parentais e os híbridos indicados.

A hibridação tem tido uma importante funcionalidade no desenvolvimento de variações no gênero *Manihot* (ROGERS & APPAN, 1973) e vem sendo usada com grande frequência, na busca da transferência de genes de interesse para indivíduos mais suscetíveis (VANDERPLANK 2000; ULMER e MACDOUGAL 2004). Entretanto, em se tratando de hibridação natural, existem poucos registros dentro do gênero *Manihot* e quando existentes, é evidente a escassa sobrevivência do híbrido. A hibridação pode levar a rearranjos genéticos (RIDDLE e BIRCHLER 2003), o que contribui para grande importância de se investigar, identificar e conservar os materiais híbridos encontrados para manutenção genética do gênero *Manihot*, e que posteriormente podem contribuir para mitigar, a longo prazo, problemas que afetam diretamente a cultura da mandioca.

Geograficamente, pode-se destacar que os indivíduos 22 (*M. reniformis*) e 3 (*M. reflexifolia*) em relação aos híbridos 39, 40, 46 e 50, estão distantes fisicamente, ou seja, o parental *M. reniformis* 22 está na área externa do Parque Municipal Sempre Viva, o segundo parental *M. reflexifolia* 3, está localizado dentro Parque Municipal Sempre Viva, juntamente com os híbridos. Nesse sentido, em se tratando de um ambiente natural, pode-se considerar a ação de agentes polinizadores para a realização desse cruzamento.

De acordo com Nassar (2010), pequenos insetos da ordem Coleoptera, podem transportar grandes quantidades de pólen de flores de uma planta para outra, desempenhando um importante papel na realização de hibridação entre espécies e/ou variedades de mandioca do gênero *Manihot*.

De acordo com a matriz de dissimilaridade genética, obtida por meio do comando “alelos compartilhados”, entre os 50 indivíduos analisados, foi possível observar, além dos híbridos identificados a partir do padrão de bandas, outros que apresentaram menor distância genética em relação aos seus possíveis parentais.

Analisando as distâncias de todos os híbridos para os dois parentais em estudo, pode-se observar que entre *M. reflexifolia* e os híbridos, a distância genética variou entre 0,06 a 0,81. Entretanto, entre os híbridos e *M. reniformis* houve uma maior variação na distância genética, que variou de 0,22 a 0,72. Essa maior similaridade entre os híbridos e *M. reflexifolia*, pode estar associada ao poder discriminatório dos primers utilizados, permitindo uma maior amplificação das regiões pertencentes ao genoma de *M. reflexifolia*, ou pela distribuição geográfica entre eles, pois, a maioria dos indivíduos de *M. reflexifolia* e os híbridos estudados, foram encontrados sempre muito mais próximos, mais precisamente, dentro do Parque Municipal Sempre Viva, diferente de alguns indivíduos de *M. reniformis* que tiveram sua maior concentração na área externa do Parque. Em seus estudos, Duputié (2011), afirma que as relações filogenéticas entre as espécies de *Manihot*, estão diretamente relacionadas à sua distribuição.

Também se pode associar esses níveis de dissimilaridade genética entre os indivíduos estudados, ao comportamento dos pais quanto da hibridação, podendo *M. reflexifolia* ter se portado mais como receptora do que doadora de

grão de pólen, que se tratando de um ambiente natural esse pólen exógeno pode estar contaminado, tal como, mostra os trabalhos de hibridação conduzidos por Nassar (2007), Diaz *et. al.* (2007) e Vieira *et. al.* (2013), onde um grande número de gametas exógenos é transferido para a flor feminina, intervindo na dissimilaridade entre os pais e os híbridos resultados dos cruzamentos.

A distância genética dos híbridos 39, 40 e 50 identificados a partir do padrão de bandas com o primer SSRY 182 apresentado na figura 2, variou numa média de 0,36 em relação ao parental 3 (*M. reflexifolia*). Já entre o parental 22 (*M. reniformis*), esses possíveis híbridos apresentaram uma média de 0,35 na distância genética. Essa baixa dissimilaridade média entre os híbridos e as duas espécies, pode implicar na participação de material genético das duas espécies na formação dos mesmos.

Analisando os supostos híbridos 38, 44 e 47 identificados a partir do padrão de bandas amplificadas pelo primer SSRY 103, mostrado na figura 3, os mesmos apresentaram uma média da distância de 0,30 entre eles e o parental 1 (*M. reflexifolia*). Em relação ao segundo parental 23 (*M. reniformis*), a média da distância genética entre eles foi de 0,36. Sendo assim, com base também na matriz de dissimilaridade, pode-se supor que esses indivíduos estão relacionados geneticamente, identificando seus parentais, tendo *M. reflexifolia* e *M. reniformis* como seus parentais.

A partir da análise de agrupamento pelo método UPGMA, gerou-se um dendograma separando os indivíduos estudados em 4 grupos (Figura 4).

Entretanto, tratando-se de estudo de identificação de possíveis híbridos e seus parentais, a matriz de distância genética passa ser bastante útil, pois nos permite comparar cada híbrido isoladamente com os seus prováveis parentais, tendo como base a distância genética. Faleiro *et al.*, (2003), Santos *et al.*, (2011) fizeram uso de marcadores moleculares para discriminar a similaridade genética dos indivíduos estudados tendo como base principal a matriz de dissimilaridade.

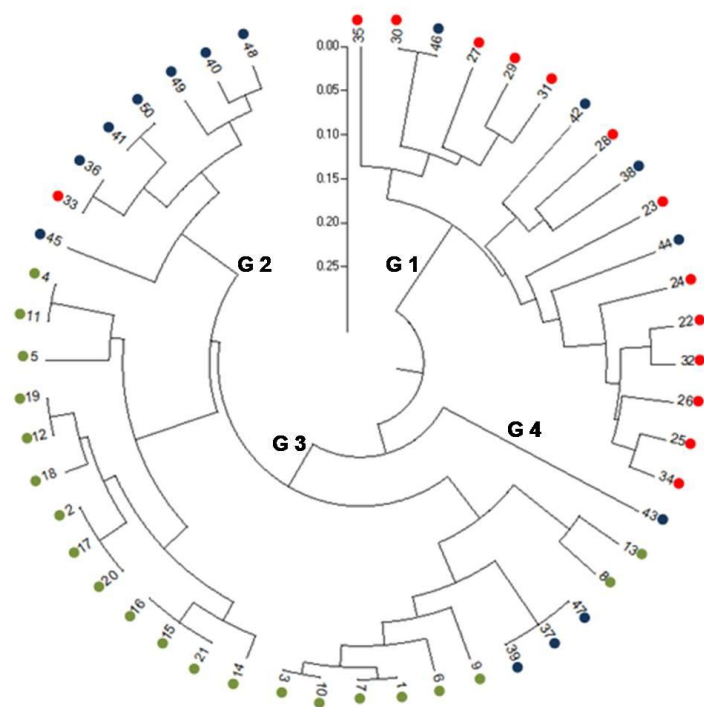


Figura 4: Dendrograma circular gerado a partir da análise de agrupamento pelo método UPGMA. Indivíduos 1 – 21 destacados em verde: *M. reflexifolia*; 22-35 destacados em vermelho correspondem a *M. reniformis* e 36 – 50 destacados em azul representam os possíveis híbridos. G1: grupo 1; G2: Grupo 2; G3: Grupo 3 e G4: Grupo 4. Indivíduos agrupados com base na dissimilaridade genética.

O grupo 1 (G1) é formado por todos os indivíduos *M. reniformis*, exceto os indivíduos 38, 42, 44 e 46 que são prováveis híbridos. Na matriz é possível observar que esses híbridos, 38, 42, 44 e 46, estão muito próximos geneticamente de *M. reniformis*, como mostra no dendrograma, apresentando distância de 0,14 a 0,17, e um pouco distante geneticamente de *M. reflexifolia*, com distância variando de 0,25 a 0,89.

O grupo 2 (G2) é composto por todos os possíveis híbridos e o grupo 3 (G3) por *M. reflexifolia*. Entretanto, deve-se destacar que alguns híbridos se distribuem entre os indivíduos *M. reflexifolia*, o que significa com base nos dados da matriz que parecem estar mais relacionados geneticamente.

Na distribuição dos dados no dendrograma, alguns indivíduos são considerados clones. A isso podemos atribuir a baixa sensibilidade dos iniciadores SSRY para estes indivíduos utilizados no estudo ou que talvez esses indivíduos sejam de origem apomítica. O fenômeno da apomixia em

espécies silvestres do gênero *Manihot* foi identificado por Nassar (1985; 2003) em *M. dichotoma* Ule e *M. glaziovii* (Müll. Arg.). Indivíduos apomíticos são idênticos à planta mãe, pois são originados a partir da reorganização das células do ovário. No entanto, esses indivíduos não são previsíveis quanto a sua morfologia devido às inferências das condições ambientais no qual ele está inserido (VIEIRA *et al.* 2013).

O híbrido 43 se destaca em relação a seu posicionamento no dendrograma, formando um grupo isolado, o grupo 4 (G4). O híbrido 43 está muito distante dos possíveis parentais (Figura 5). A maior distância dele em relação aos supostos parentais, *M. reflexifolia* e *M. reniformis*, é de 0,69 e 0,63, respectivamente.

Ao comparar o indivíduo 43 com os demais híbridos avaliados, observa-se também, uma alta distância genética, variando de 0,25 a 0,56.

O híbrido 43 pode até mesmo ser considerado uma possível nova espécie dado seu distanciamento genético. Entretanto, os estudos moleculares conduzidos neste trabalho somente, não permitem esse tipo de conclusão. Sendo assim, são necessários outros tipos de estudos correlacionados à filogenia, à morfologia e também o uso de um número maior de marcadores com alto valores de PIC (*Polymorphism Information Content*), até mesmo marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) para melhor discriminação e aliados às informações de sequenciamento genético.

Entretanto, os marcadores SSR usados no presente estudo foram capazes de separar as duas espécies e apontar possíveis híbridos dentro do material selecionado morfologicamente.

A identificação dos híbridos junto aos seus progenitores confirma as fracas barreiras de isolamento reprodutivo, existente no gênero *Manihot*, gerando variabilidade genética que, ao ser explorada, poderá auxiliar na mitigação dos principais fatores bióticos e abióticos da cultura.

Análise citogenética:

Este é o primeiro trabalho citogenético que faz uso da técnica de Hibridação Genômica *in situ* - GISH com espécies silvestres do gênero *Manihot*. Sendo assim, houve necessidade de se ajustar metodologias para obtenção de resultados mais consistentes. Outros gêneros da família Euphorbiaceae, no entanto, foram estudados citogeneticamente, como *Ricinus* (VASCONCELOS 2010); *Manihot* (MAGOON 1970; NASSAR 2000; CARVALHO & GUERRA 2002; CARVALHO *et al.*, 2009); *Jatropha* (SOUZA, 2014), porém, apenas no gênero *Jatropha*, foi aplicada a técnica de GISH (SOUZA, 2014).

Melo *et al.* (2015), realizaram estudos com *Passiflora* fazendo uso de GISH e afirmaram que os ajustes de metodologias são as maiores dificuldades na aplicação da técnica. Esses ajustes estão relacionados principalmente com a concentração de DNA bloqueador de um dos parentais envolvidos para permitir a distinção dos genomas parentais pós-hibridização.

Apesar de cromossomos morfologicamente pequenos e similares, foi possível a execução da GISH nos híbridos naturais de *Manihot* junto aos seus parentais *M. reflexifolia* e *M. reniformis* a partir de células mitóticas em metáfase. Para a definição das proporções sonda/DNA bloqueador foram feitos vários testes, sendo que a melhor proporção, sonda (*M. reflexifolia*)/bloqueio (*M. reniformis*), foi de 1:40 (Figura 6 A – M).

Segundo Schwarzacher e Haslop-Harrison (2000), para estabelecimento da GISH, faz-se necessário reparar e otimizar diversos fatores como: variações nas concentrações sonda: bloqueio de DNA dos genitores; tamanhos dos fragmentos de DNA para preparação das sondas/bloqueio e células mitóticas com metáfase de qualidade.

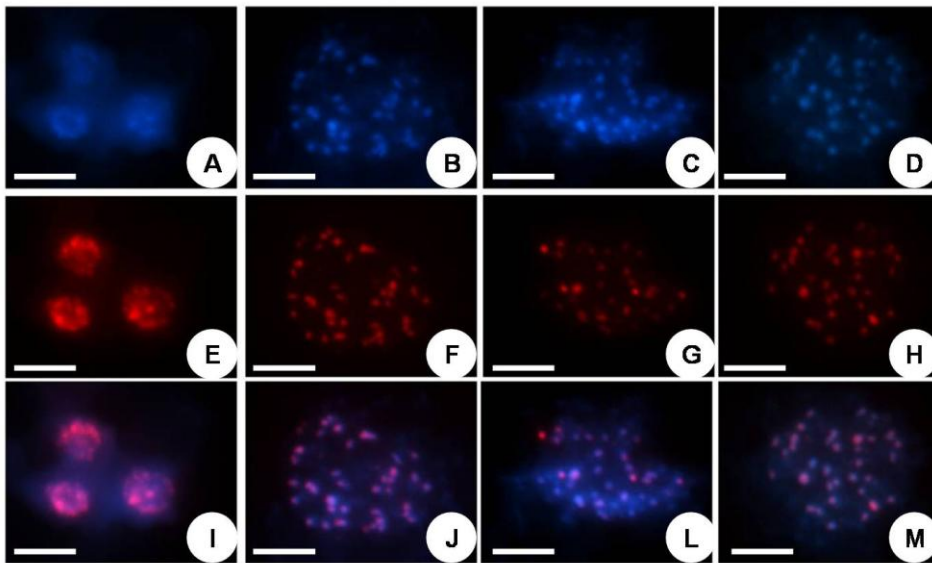


Figura 6: Teste da sonda genômica em células metafásicas dos supostos híbridos, tendo *M. reflexifolia* com sonda e *M. reniformis* como bloqueio na proporção de 1:40. A – D: Visualização das lâminas com o corante DAPI; E – H: Visualização da sonda marcando os cromossomos. I – M: Sobreposição das colorações. Escala da barra = 10 μ l.

Devido ao aprimoramento da técnica, a figura 7 apresenta uma metáfase do híbrido incompleta, podendo-se visualizar apenas parte do seu cariótipo, o que não implica na observação da hibridização e funcionalidade da técnica.

A GISH realizada nas células em metáfase dos híbridos apresentou corados em vermelho, cromossomos hibridizados ao DNA genômico de *M. reflexifolia*. Os cromossomos corados em azul são oriundos de *M. reniformis*. (Figura 7C). O DNA de *M. reflexifolia* utilizado como sonda, que hibridizou regiões dos cromossomos presente na metáfase dos híbridos e o DNA de *M. reniformes* usado como bloqueio, anelou-se em regiões complementares nos cromossomos dos híbridos, impedindo nessas regiões a hibridização da sonda, e tornando possível a identificação das espécies silvestres como progenitores dos híbridos.

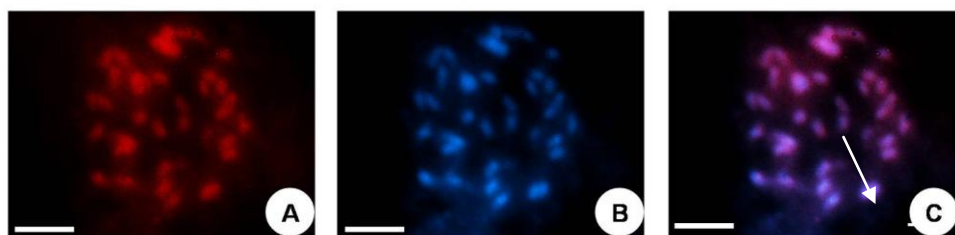


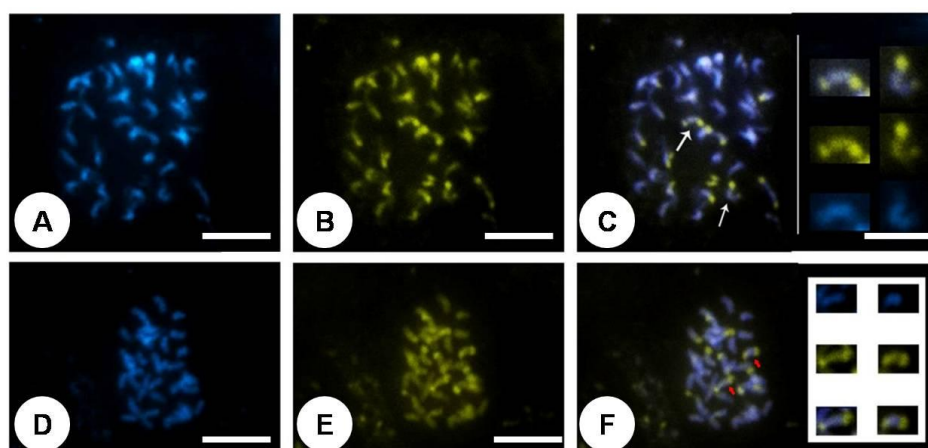
Figura 7 (A-C): Hibridização Genômica *in situ*. A e B – Lâminas com sonda de *M. reflexifolia* e Bloqueio de *M. reniformis*, visualizada em corantes diferentes; C – Sobreposição dos corantes e hibridização cromossômica na lâmina do híbrido. Observando-se cromossomos em vermelho hibridizando regiões do genoma de *M. reflexifolia* e em azul, regiões do genoma do híbrido semelhantes ao de *M. reniformis*. Escala da barra = 10 μ l.

O uso da técnica GISH para identificação de híbridos naturais ou artificiais e para a detecção de cromossomos recombinados tem sido aplicada em diversos grupos de plantas (MARASEK *et al.*, 2004; CONTRERAS *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2015). Neste estudo, a técnica de GISH foi aplicada pela primeira vez em *Manihot*, a fim de se identificar no cariótipo dos híbridos e os genomas dos genitores *M. reflexifolia* e *M. reniformis*. A técnica continua sendo aprimorada para o gênero, mas foi possível confirmar o caráter híbrido dos indivíduos investigados, sendo *M. reflexifolia* e *M. reniformis*, seus parentais. Não foi possível, entretanto, detectar a ocorrência de cromossomos recombinantes, possivelmente devido os híbridos serem de origem recente. Híbridos antigos podem apresentar grandes quantidades de translocações entre seus cromossomos em processos contínuos de estabilização e recuperação da meiose para produção de gametas viáveis (CHASE *et al.* 2003).

Com a coloração feita com os fluorocromos CMA e DAPI, foi possível observar que *M. reflexifolia* e *M. reniformis*, junto aos híbridos, compartilham um cariótipo estável, com número cromossômico $2n=36$ (Figura 8 - 10). Esse tipo de análise também permitiu confirmar que os híbridos naturais realmente são oriundos do cruzamento entre *M. reflexifolia* e *M. reniformis*.

Observando-se as células em metáfase nas lâminas de *M. reflexifolia*, detectou-se um par de cromossomos corado positivamente com CMA nas duas regiões teloméricas o que não é comum dentro do gênero *Manihot*. Carvalho &

Guerra (2002) realizaram análise citogenética com espécies do gênero *Manihot* usando coloração CMA/DAPI. Para todos os cariótipos, foi observado apenas padrões de bandas com marcação em um dos telômeros com CMA+. A coloração CMA tem afinidade com regiões heterocromáticas ricas em pares de base citosina e guanina, regiões consideradas conservadas. Sendo assim, buscou-se nas lâminas dos híbridos e de *M. reniformis* essa mesma marca nos dois telômeros observada em *M. reflexifolia* com CMA/DAPI (Figura 8 A – F).



Figuras 8 (A – F): Lâminas mitóticas de *M. reflexifolia* coradas com CMA/DAPI. A e B: Cromossomos corados de DAPI e CMA respectivamente; C – Sobreposição dos fluorocromos, sendo possível observar cromossomos com bandas CMA nos dois braços. D e E: Diferentes metáfases mostrando essa marca; F: Ampliação do par de cromossomos com a marca CMA nos dois braços. Escala da barra = 10µl.

Em *M. reniformis* não foi encontrada esta marca CMA+ no telômero do braço curto e do braço longo do par de cromossomos homólogos, após a coloração das lâminas com CMA/DAPI (Figura 9 A – C). Já nos indivíduos híbridos analisados, foi possível observar essa marca CMA no telômero do braço curto e do braço longo em apenas um dos cromossomos (marcação em heterozigose) (Figura 10 A – M) estando os demais cromossomos do complemento corados em apenas uma região, como os apresentados em *M. reniformis*

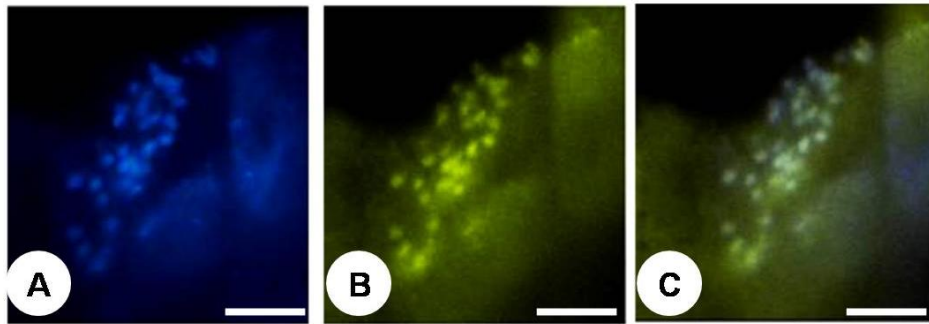


Figura 9 (A – C): Lâminas mitóticas de *M. reniformis* coradas com fluorocromo, A: Coloração com DAPI; B: Coloração com CMA; C: Sobreposição das imagens 16 e 17. Visualização da marcas CMA em amarelo e DAPI em azul, sem a presença de cromossomos corados com CMA nos telômeros dos dois braços. Escala da barra = 10 μ l.

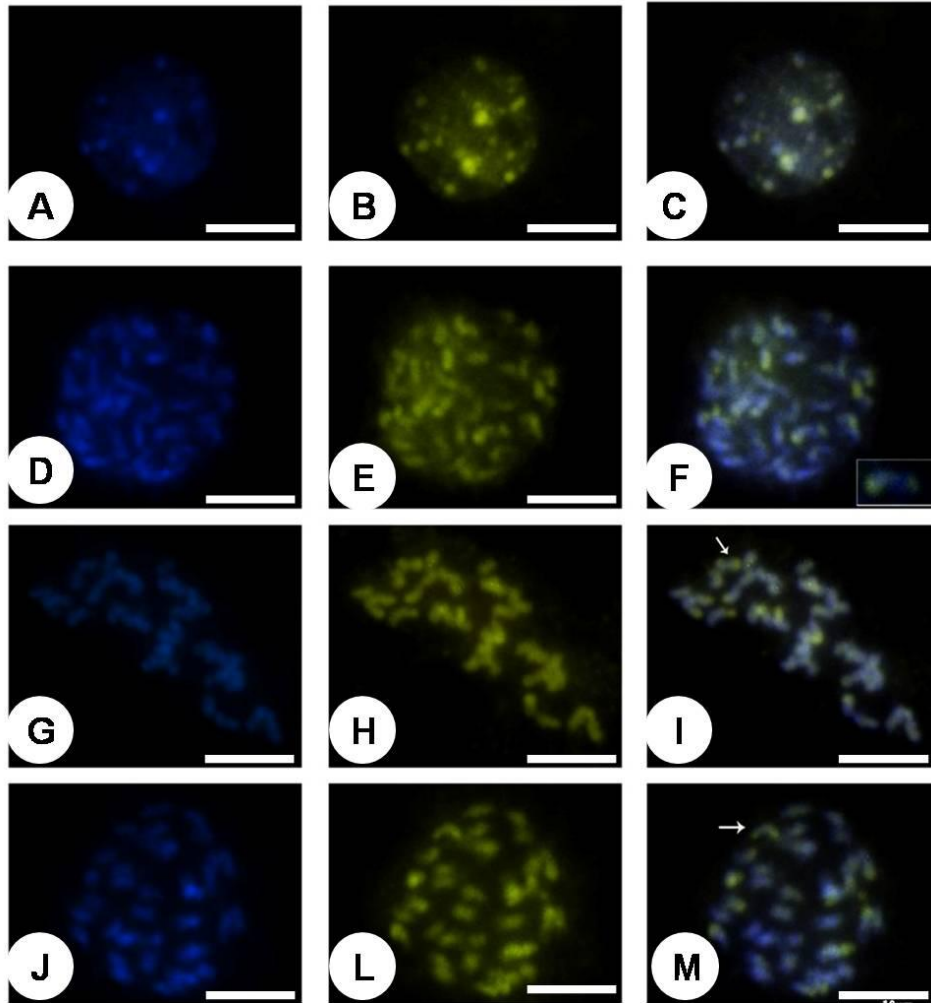


Figura 10 (A – M): Lâminas dos híbridos coradas com fluorocromo CMA – DAPI. A - C: Núcleos interfásicos, sendo possível observar cromossomos com o sinal de CMA; D - M: Metáfase com a presença do cromossomo com a marca CMA, presente em *M. reflexifolia*, estando os demais corados em apenas uma região do CMA ou sem marcação do sinal CMA em amarelo, em azul coloração DAPI; Setas em I e M apontam o cromossomo com marcação em ambos os braços cromossômicos corados com CMA – DAPI. Escala da barra = 10 μ l.

Carvalho *et al.* (2009), analisando os cromossomos metafásicos mitóticos de espécies do gênero *Manihot*, observaram uma diferença marcante no número e posição das regiões organizadoras dos nucléolos entre *M. leptophylla* Pax & K. Hoffm e *M. glaziovii*, sendo este considerado um bom marcador espécie-específico. Sendo assim, pode-se fazer uso dessa marca, considerando a coloração com CMA como um bom marcador espécie-específico, afirmando assim, a origem genética dos híbridos naturais, indicando seus parentais por meio do uso de características citogenéticas.

Análises de viabilidade polínica

Para análises da viabilidade polínica de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos possíveis híbridos naturais, utilizou-se o corante azul de Alexander, o qual cora de verde os grão de pólen inviável e de avermelhado os grãos de pólen viável (Alexander, 1980). Analisou-se um total de 60 lâminas, contendo uma antera cada, sendo 20 lâminas por espécies (*M. reniformes* e *M. reflexifolia*) e 20 para o possível híbrido natural (Tabela 2).

Tabela 2: Viabilidade polínica das espécies *M. reniformis*, *M. reflexifolia* e dos possíveis híbridos. O total de grãos de pólen foi observado em 20 lâminas de cada espécie e do possível híbrido.

	<i>M. reniformis</i>	<i>M. reflexifolia</i>	Híbridos
Grãos de pólen viável	4.727	5.334	5.717
Grão de pólen inviável	260	126	138
Total analisado	4.985	5.460	5.855

Em *M. reniformis*, 96,7% dos grãos de pólen foram viáveis e 5,3% mostraram-se não viáveis. Observando as lâminas de *M. reflexifolia*, 97,6% dos grãos de pólen identificados de um total de 5.460, foram viáveis e 2,3%, não viáveis. Os híbridos apresentaram resultados semelhantes a *M. reflexifolia* quanto à viabilidade polínica, apresentando 97,6% de grão de pólen viável, e 2,3% do total mostraram-se não viáveis.

Estudar a viabilidade do grão de pólen permite identificar o potencial das plantas para cruzamentos. Para Peñaloza (1995), este estudo é importante para investigar possibilidades de reprodução de uma população e determinar causas de infertilidade.

Souza (2014) afirma que percentuais de viabilidade polínica acima de 70% são consideradas plantas com alta viabilidade do pólen, de 31 a 69%, como média e até 30%, baixa. No entanto, *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e os possíveis híbridos, apresentaram alta viabilidade polínica, destacando-se os resultados para *M. reniformis*, que diante dos grãos de pólen analisados, obteve o maior índice para grãos de pólen inviáveis. Souza *et al.* (2002), assegura que a viabilidade polínica depende da homologia cromossômica entre os indivíduos envolvidos no cruzamento (Figura 11 A – F).

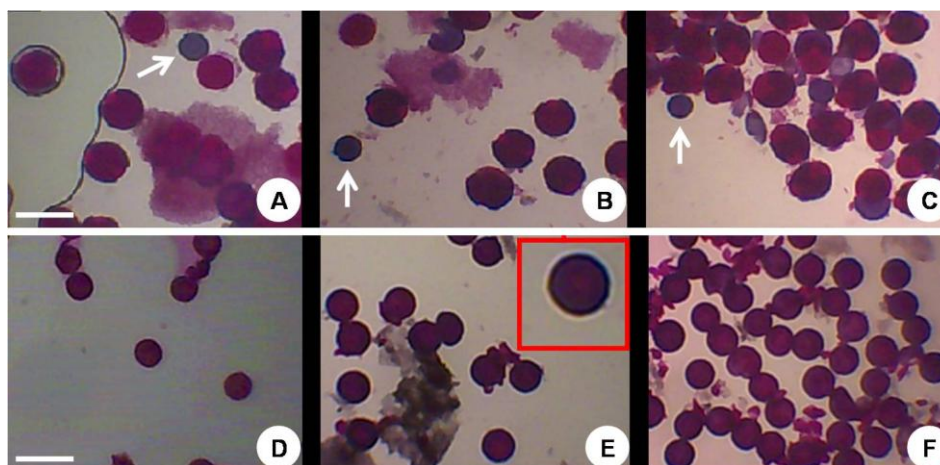


Figura 11 (A – F): Grãos de pólen corados com azul de Alexandre. A e D: Grãos de pólen de *M. reniformis*; B e E: Grãos de pólen de *M. reflexifolia*; C e F: Grãos de pólen dos híbridos. Setas em branco indicando grãos de pólen inviável (B e C). Em vermelho, ampliação do grão de pólen viável (A). Escala da barra = 30µl.

Análises das lâminas com coloração convencional de *M. reflexifolia*, *M. reniformis* e dos híbridos, mostraram que os indivíduos investigados, apresentam cariótipos semelhantes quanto o tamanho e quantidade dos cromossomos (Figura 12 A – C).

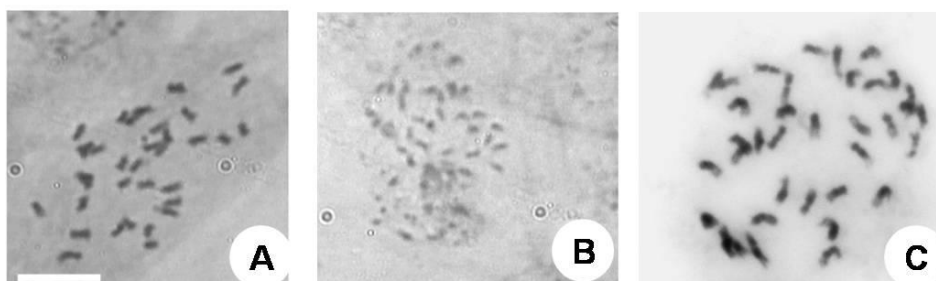


Figura 12 (A – C): Lâminas em metáfase com coloração convencional por meio do corante Giemsa 2%. A: *M. reflexifolia*; B: *M. reniformis*; C: híbrido. $2n = 36$. Escala da barra = 10 μ l.

Todos apresentaram cromossomos de tamanhos pequenos e exibiram $n=18$ ou $2n=36$, como encontrados por Magoon *et al.* (1970); Nassar (1978); Nassar *et al.* (1998); Nassar (2000); Carvalho & Guerra (2002); Carvalho *et al.* (2009) em trabalhos com *Manihot*, confirmando assim, a forte homogeneidade do cariótipo (CARVALHO *et al.* 2009) e as fracas barreiras de isolamento reprodutivo (NASSAR 2000) das espécies do gênero *Manihot*.

Conclusões

A identificação e caracterização, molecular e citogenética, de espécies silvestres e de híbridos naturais contribui em grande escala para a variabilidade do gênero, a qual pode ser investigada junto a programas de conservação e melhoramento.

Os primers SSR utilizados mostraram-se eficientes quanto a discriminabilidade das espécies *M. reniformis* e *M. reflexifolia*, identificando a partir do padrão de bandas, suas possíveis progênies. A eficiência da transferabilidade desses primers também foi confirmada neste estudo

A técnica GISH ainda necessita de alguns ajustes para melhor eficiência dentro do gênero *Manihot*, ajustes relacionados à proporção de sonda e DNA bloqueio. Uma vez que, este o primeiro trabalho a utilizar GISH no gênero *Manihot*, é pertinente afirmar que a técnica foi eficiente na identificação dos híbridos junto aos seus progenitores.

Dentre todos os trabalhos em diferentes espécies do gênero *Manihot* utilizando a técnica CMA/DAPI, este foi o primeiro a detectar uma banda CMA+ nos telômeros de um par de cromossomos. Como visto em *M. reflexifolia*, essa banda se torna um bom marcador espécie – específico, subsidiando outros estudos do gênero.

A técnica CMA/DAPI foi eficiente na identificação das espécies silvestres em estudo como progenitoras dos híbridos investigados, confirmando os resultados da GISH.

A partir dos resultados da viabilidade polínica identificou-se o potencial das plantas para cruzamentos, gerando os híbridos identificados.

O uso de técnicas da biologia molecular e da citogenética foram eficientes na identificação dos híbridos, contribuindo, sobretudo, para estudos posteriores sobre o gênero *Manihot*, permitindo a identificação de novas potencialidades dos híbridos e dos seus progenitores, a conservação e multiplicação desses materiais em outros ambientes fora do seu natural, gerando informações que podem sanar os principais problemas do gênero.

Referências

Alexander, M.P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, v. 55, p. 13 – 18, 1980.

Borém, Aluizio. *Melhoramento de plantas*. UFV, 1997.

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

Carvalho, L. J. C. B.; Schaal, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. *Euphytica*, v. 120, p. 133-142, 2001.

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

Carvalho, R.; Soares Filho, W.S.; Brasileiro-Vidal., A.C.; Guerra M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenetic and genome research*, v. 109, p. 276-282, 2005.

Carvalho, R.; da Silva, K. V. P.; de Oliveira, I. F.; Alves, A. A. C. Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot*. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*, v. 5, p. 645-650, 2009.

Chase, M. W.; Knapp, S.; Cox, A. V.; Clarkson, J. J.; Butsko, Y.; Joseph, J.; Parokony, A. S. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany*, v.92, p. 107-127, 2003.

Colombo, C.; Second, G.; Charrier, A. Diversity within American cassava germ plasm based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.23, p. 189-199, 2000.

Contreras, R. N.; Ruter, J. M.; Conner, J.; Zeng, Y.; Ozias-Akins, P. (2012). Confirmation of hybridity using GISH and determination of 18S rDNA copy number using FISH in interspecific F1 hybrids of *Tecoma* (Bignoniaceae). *Genome*, v. 55, p. 437-445, 2012.

Cristofani, M.; Novelli, V. M. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. *Citrus Research & Technology*. Cordeirópolis – SP, v.22, p 231-241, 2001.

Diaz, A. A.; Martín, P.; Rallo, R.; De la Rosa. Crosscompatibility of the genitors as the main factor for successful olive breeding crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 132, p. 830–835, 2007.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.

Duputié, A.; Salick, J.; McKey, D. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. *Journal of Biogeography*, v. 38, p. 1033-1043, 2011.

Elias, M.; Mühlen, G.S.; McKey, D.; Roa A.C.; Tohme J. Genetic diversity of traditional south american landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. *Economic Botany*, v. 58, p. 242-256, 2004.

Faleiro, F. G.; Barros, A.M.; Faleiro, A.S.G.; Cordeiro, M.C.R.; Karia, C.T.; Gomes, A.C.; Andrade, R.P. Caracterização molecular e estabelecimento de coleção de trabalho de *Stylosanthes macrocephala* com base em marcadores RAPD. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 40. Santa Maria. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003.

Faleiro, F. G. Marcadores genético-moleculares. Planaltina: Editora Embrapa, p. 102, 2007.

Guerra, M. Hybridization in Situ: Princípios Básicos. In: FISH: Focinhos e Aplicações na Citogenética (Guerra M, ed.). Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 1-32, 2004.

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

Gaudeul, M.; Till-Bottraud, I.; barjon, F.; Manel, S. Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, v. 92, p. 508–518, 2004.

Kim, E. S.; Punina, E. O.; Rodionov, A. V. Chromosome CPD (PI/DAPI)-and CMA/DAPI-Banding Patterns in *Allium cepa* L. *Russian Journal of Genetics*, v. 38, p. 392-398, 2002.

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

Magoon, M.L.; Krishnan, R.; Vijayabai, K. Cytogenetics of the F₁ hybrid between cassava and ceara rubber and its back crosses. *Genetica*, v. 41, p. 3-12, 1970.

Mba, R. E. C.; Stephenson, P.; Edwards, K.; Melzer, S.; Nkumbira, J., Gullberg, U.; Fregene, M. 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*, v. 102, p.21-31, 2001.

Marasek, A.; Hasterok, R.; Wiejacha, K.; Orlikowska, T. Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. *Hereditas*, v. 140, p. 1-7, 2004.

Marquez-Lema, A.; Velasco, L.; Pérez-Vich, B. Transferability, amplification quality, and genome specificity of microsatellites in *Brassica carinata* and related species. *Journal of Applied Genetics, Poznan*, v. 51, p.123-131, 2010.

Melo, C. A. F.; Silva, G. S.; Souza, M. M. Establishment of the genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. *Genetics and molecular research*, v.14, p. 2176, 2015.

Nassar, N.M.A. Microcenters of wild cassava, *Manihot* ssp. diversity in central Brazil. *Turrialba*, v. 28, p.345-347, 1978.

Nassar, N.M.A. *Manihot neusana* Nassar: a new species native to Paraná, Brazil. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 65, p. 1097-1100, 1985.

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

Nassar NMA, Vieira MA, Vieira C and Grattapaglia,(1998). Molecular and embryonic evidence of apomixes in cassava interspecific hybrids (*Manihot* spp.), *Can. J. Sci.* 78: 349–352.

Nassar, N.M.A. Cytogenetics and evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, p.1003-1014, 2000.

NASSAR, N.M. A. Is apomixis in cassava associated with aneuploidy? *Gene Conserve*, v. 2, p.106–110, 2003.

Nassar, N.M.A. Chromosome doubling induces apomixis in cassava x *Manihot anomala* hybrid. *Hereditas. Genetics and Molecular Research*, v.143, p. 246-248, 2006.

Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Vencovsky,R.; Vieira, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetic and Molecular Biology*, v. 29, p. 294–307, 2006.

Olsen, KM. Population history of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Ecology*, v. 11, p.901–911, 2002.

Peñaloza, A.P.S. Caracterização de componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* (Leguminosae). Dissertação, Departamento de Agonomia, Universidade de Brasília, p. 82, 1995.

Riddle, N. C.; Birchler, J. A. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends in Genetics*, v. 19, p. 597-600, 2003.

Rogers, D. J.; Appan, S.G. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): A Computer Assisted Study. Flora Neotropica. Monograph. Hafner Press, New York, 1973.

Santos, R. P.; Cristo-Araújo, M. D.; Picanço-Todrigues, D.; Astolfi Filho, S.; Clement, C. R. Genetic variability and gene flow in hybrid and wild populations of peach palm accessed with rapd markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, p. 1200-1208, 2011.

Santos, E. A.; Souza, M. M.; Abreu, P. P.; Araújo, I. S.; Viana, A. P., de Almeida, A. A. F.; de Oliveira Freitas, J. C. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L.(Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica*, v.184, p. 389-399, 2012.

Schuck, M. R.; Biasi, L. A.; Mariano, A.M.; Lipski, B.; Riaz, S.; Walker, M. A. Obtaining interspecific hybrids, and molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, p. 1480–1488, 2011.

Schwarzacher, T.; Haslop-Harrison, P. *Practical in Situ Hybridization*. Springer, 2000.

Silva, K.P.V. Caracterização citogenética e molecular de espécies e variedades do gênero *Manihot*,. Dissertação. Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011.

Souza, M.M.; Pereira, T.N.S.; Martins, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência agrotecnologia*, v.26, p.1209-1217, 2002.

Souza, R.C. Caracterização citogenética de híbridos de *Jatropha curcas* L. e espécies relacionadas. Dissertação. Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.

Sumner, A. T. Chromosomes: Organization and Function. Oxford - United Kingdom. Blackwell Publishing, 2003.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

Ulmer, T.; MacDougal, J.M. *Passiflora: passionflowers of the world*. Timber Press, Portland, 2004.

Umanah, E.E.; Hartmann, R.W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. *J Am Soc Hortic Sci*, v.98, p. 272- 274, 1973.

Uhrin, A.; Szakács, E.; Láng, L.; Bedő, Z.; Molnár-Láng, M. Molecular cytogenetic characterization and SSR marker analysis of a leaf rust resistant wheat line carrying a 6G (6B) substitution from *Triticum timopheevii* (Zhuk.). *Euphytica*, v. 186, p. 45-55, 2012.

Vanderplank, J. *Passion flowers*. The MIT Press, Cambridge, 2000.

Vasconcelos, S.S.; Souza, A.A.; Gusmão, C.L.S.; Milani, M.; Benko-Iseppon, A.M.; Brasileiro-Vidal, A.C. Heterochromatin and 73 rDNA 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). *Micron*, v.41, p. 746-753, 2010.

Vieira, L. D. J.; Tavares Filho, L. D. Q.; Souza, F. V. D.; Alves, A. A. C.; De Oliveira, E. J. Development of interspecific hybrids of cassava and paternity analysis with molecular markers. *The Journal of Agricultural Science*, v. 151, p. 849-861, 2013.

Weiler, R. L.; Brugnara, E. C.; Bastianel, M.; Machado, M. A.; Schifino-Wittmann, M. T.; Souza, P. V. D.; Schwerz, S. F. (2009). Teste de paternidade

e avaliações agronômicas de possíveis híbridos de tangerineira 'Sunki'. *Scientia Agraria*, v. 10, p. 429-435, 2009.

Younis, A.; Ramzan, F.; Hwang, Y. J.; Lim, K. B. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant Cell Reports*, v. 34, p.1477-1488, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstraram que o uso de técnicas de diferentes áreas foi eficiente na caracterização e identificação dos híbridos e dos seus progenitores.

A anatomia vegetal foi eficiente na caracterização e identificação dos indivíduos em estudos, a partir de caracteres anatômicos e subsidiou a taxonomia dos híbridos e seus progenitores.

Iniciadores microssatélites SSR foram eficientes na discriminação das espécies em estudos e dos híbridos, contribuindo para identificação da variabilidade genética e das relações filogenéticas. Identificar os progenitores junto aos híbridos, a partir do padrão de bandas de amplificação, mostrou-se ser um método eficiente na análise dos dados moleculares. O resultado encontrado na técnica de CMA/DAPI, banda CMA+ nos telômeros de um par de cromossomos foi de suma importância na identificação dos híbridos e poderá subsidiar novos estudos citogenéticos que visem identificar espécies do gênero *Manihot*.

Existe a necessidade de aprimorar a técnica GISH para a citogenética de *Manihot* para que seja possível obter um maior progresso quanto a sua aplicabilidade.

A identificação dos híbridos, somada aos resultados de viabilidade polínica, confirma a existência de fracas barreiras de isolamento reprodutivo, no gênero, o que facilita a hibridação entre as espécies, gerando variabilidade genética a qual pode solucionar problemas bióticos e/ou abióticos que afetam a cultura.

O uso de diferentes ferramentas permitiu a identificação de um novo híbrido natural no gênero *Manihot*, indicando que no gênero existe um importante reservatório genético ainda a ser investigado e explorado.