

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
TESE DE DOUTORADO**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E DETECÇÃO DE VARIAÇÃO
SOMACLONAL POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES EM
PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)
REGENERADAS *IN VITRO***

ÁDILA MELO VIDAL

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
DEZEMBRO – 2013**

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E DETECÇÃO DE VARIAÇÃO
SOMACLONAL POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES EM
PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) REGENERADAS
IN VITRO

ÁDILA MELO VIDAL

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal da Bahia, 2005

Tese submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Co-orientadoras: Dr^a Cláudia Fortes Ferreira

Dr^a Fernanda Vidigal Duarte Souza

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

V648e	<p>Vidal, Ádila Melo.</p> <p>Embriogênese somática e detecção de variação somaclonal por meio de marcadores moleculares em plantas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) regeneradas <i>in vitro</i> / Ádila Melo Vidal. – Cruz das Almas, BA, 2013.</p> <p>92f.; il.</p> <p>Orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo. Coorientadora: Cláudia Fortes Ferreira.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Mandioca – Genética. 2.Mandioca – Embrião – Propagação <i>in vitro</i>. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Souza, Fernanda Vidigal Duarte. III.Título.</p> <p>CDD: 633.682</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
ÁDILA MELO VIDAL

Carlos Alberto da Silva Ledo

Membro Presidente: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Tatiana Góes Junghans

Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Tatiana Góes Junghans
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rogério Mercês Ferreira Santos

Membro Externo à Instituição: Prof. Dr. Rogério Mercês Ferreira Santos
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Edna Lôbo Machado

Membro Externo ao Programa: Profa. Dra. Edna Lôbo Machado
Instituição: UFRB

Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Membro Interno do Programa: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Instituição: UFRB

Homologada em / / .

A meu companheiro Jefferson Oliveira de Sá pelo apoio, confiança e carinho.

Dedido

Aos meus pais Dirce Mário Vidal (*in memorian*) e Dulce Melo Vidal (*in memorian*).

Aos meus amigos.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A DEUS que sempre me deu forças para vencer todos os desafios e acreditar que todos os sonhos são possíveis.

Ao Pesquisador Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo pela oportunidade, orientação e confiança na realização deste trabalho.

A Pesquisadora Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza pela orientação, conselhos, amizade, e por estar sempre disposta a colaborar com realização deste trabalho.

A Dr^a. Cláudia Fortes Ferreira, pela co-orientação nos trabalhos de biologia molecular.

Ao Pesquisador Dr. Antônio da Silva Souza pela colaboração na realização deste trabalho, confiança e amizade.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelo suporte técnico na realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB, em especial a Deyse Gonçalves.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, que estiveram presentes em minha vida desde a graduação, contribuindo com seus ensinamentos, disposição, carinho e amizade.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio e incentivo.

À funcionária Zara pela disponibilidade em ceder material e informações sobre os acessos de mandioca utilizados neste trabalho e Antonio ('Mestre') por me acompanhar nas coletas.

Aos colegas do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias (Turma 2010), em especial, Laurenice.

A toda a minha família pelo incentivo e apoio, em especial ao meu irmão Derlon Melo Vidal e minha tia Maria Domingas da Paz Vidal.

A todos da família Correia de Sá que me acolheram como uma filha.

Ao meu Amor Jefferson por sempre acreditar em meu potencial e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos Gal, Edilene, Jamile, Daniela, Taliane, Ronilze, Marise Marques, e em especial Lívia Vieira pela constante força, incentivo e apoio na realização deste trabalho.

A todos, os meus sinceros e profundos agradecimentos.

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....01

Capítulo 1

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM VARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz).....13

Capítulo 2

FIDELIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) UTILIZANDO MARCADORES ISSR...41

Capítulo 3

HOMOGENEIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE MANDIOCA REGENERADAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA UTILIZANDO MARCADORES ISSR E IRAP..61

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....80

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E DETECÇÃO DE VARIAÇÃO SOMACLONAL POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES EM PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) REGENERADAS *IN VITRO*

Autora: Ádila Melo Vidal

Orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo a otimização dos protocolos de embriogênese somática e a detecção de variação somaclonal em plantas de mandioca regeneradas por dois sistemas de propagação, mediante o uso de marcadores moleculares ISSR e IRAP. No estudo da embriogênese somática, calos foram induzidos a partir de ápices caulinares e folhas imaturas de quatro acessos de mandioca, cultivados em meio de indução suplementado com 0, 2, 4, e 8 mg L⁻¹ de picloram na ausência ou presença de glutamina (100 mg L⁻¹). Houve formação de calos em todos os tratamentos exceto naqueles em que não continham auxina. Os calos apresentaram diferentes texturas a depender das combinações hormonais e explantes utilizados. Após avaliação, os calos foram multiplicados a cada 60 dias nas mesmas condições anteriores, por um período de 180 dias, registrando-se o número de calos em cada subcultivo. Houve interação significativa entre acessos de mandioca, ausência ou presença de glutamina e concentrações de picloram em ambos os explantes utilizados, no crescimento e multiplicação dos calos. A presença de embriões em diferentes estádios só foi registrada no segundo subcultivo da fase de multiplicação de calos. Dos quatro acessos utilizados, três formaram embriões somáticos, com regeneração em plantas apenas para dois acessos. Os embriões formados foram transferidos para meio de maturação, seguido da passagem em meio de germinação e as plantas regeneradas apresentaram desenvolvimento normal. No estudo de fidelidade de plantas provenientes do cultivo de meristemas foram utilizados 22 acessos de mandioca. De cada acesso foi extraído o DNA da planta mantida no campo, e de três plantas cultivadas *in vitro*. Para a amplificação do DNA, foram utilizados 27 *primers* ISSR, sendo 24 selecionados para realização das análises moleculares. A partir da matriz de distância genética obtida pelo índice do complemento de Jaccard, foi realizado o agrupamento dos genótipos utilizando-

se o método UPGMA (*Unweighed Pair Group Method using Arithmetic Averages*). No estudo de fidelidade genética, para a maioria dos acessos micropropagados, não ocorreu variação genética entre plantas do mesmo acesso mantidas em campo e *in vitro*, confirmando a alta estabilidade genética das plantas micropropagadas. Entretanto, foi observada variabilidade genética entre os diferentes acessos do campo avaliados, e o agrupamento com base na matriz de dissimilaridade revelou a formação de seis grupos distintos. Os marcadores ISSR foram eficientes na determinação da homogeneidade genética de plantas de mandioca oriundas da cultura de meristemas, demonstrando confiabilidade nesse sistema de propagação. Quanto ao estudo de homogeneidade genética de plantas de dois acessos de mandioca derivadas de embriões somáticos após dois subcultivos, foram comparadas com a planta-mãe, representada pela planta mantida no campo, e por uma planta derivada do cultivo de meristemas mantida *in vitro*. De cada acesso foi realizado a extração de DNA das plantas provenientes das três condições de cultivo. Na amplificação foram selecionados 14 *primers* ISSR e quatro IRAP. Não ocorreu variação no padrão molecular entre plantas provenientes das três condições de cultivo para ambos os acessos, indicando que nesta forma de propagação, as plantas de mandioca mostram-se geneticamente estáveis.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, Fidelidade genética, Marcadores moleculares.

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND DETECTION OF SOMACLONAL VARIATION OBTAINED BY MOLECULAR MARKERS IN CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz) REGENERATED *IN VITRO*

Author: Carlos Alberto da Silva Ledo

Advisor: Carlos Alberto da Silva Ledo

ABSTRACT: The aim of this study was to optimize protocols of somatic embryogenesis and detection of somaclonal variation in plants regenerated by two cassava propagation systems, through the use of IRAP and ISSR molecular markers. In the study of somatic embryogenesis, callus was induced from shoot tips and immature leaves from four cassava accessions grown in induction medium supplemented with 0, 2, 4, and 8 mgL⁻¹ of picloram in the absence or presence of glutamine (100 mg L⁻¹). Callus formation was observed in all treatments except those that contained no auxin. Calli showed different textures depending on the hormonal combinations and explants. After assessment, the calluses were multiplied every 60 days in the same conditions, for a period of 180 days, recording the number of callus on each subculture. There was a significant interaction between cassava accessions, absence or presence of glutamine and picloram concentrations in both explants, growth and multiplication of callus. The presence of embryos at different stages was only recorded in the second subculture of callus multiplication phase. Three of the four accessions used formed somatic embryos, with regenerated plants for only two accessions. Embryos formed were transferred to maturation medium, followed by passage in germination medium and regenerated plants showed normal development. In the study of fidelity of plants from cultivation meristems 22 cassava accessions were used. DNA was extracted from young leaves of cassava plants in the field, and three plants grown *in vitro*. Twenty-seven ISSR primers were used in the amplification and 24 selected for the molecular analysis. The distance matrix was obtained by the Jaccard index and the clusters by the UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) method. There was no genetic variation for most of the of the plants from the same accessions maintained in the field and *in vitro*, confirming the genetic fidelity of the micropropagated plants. Genetic variability, however, was observed among the accessions evaluated in the field, and cluster

based on the dissimilarity matrix revealed the formation of six distinct groups. ISSR markers were effective in determining the genetic homogeneity of the cassava plants derived from meristem culture, demonstrating reliability of this propagation system. Regarding the study of genetic homogeneity of two plants cassava accessions derived from somatic embryos after two subcultures, it were compared with the parent plant, represented by the plant remains on the field, and with one derived from cultivation of plant meristems maintained *in vitro* .DNA extraction from plants from three growing conditions was made for each accessionsion. Fourteen ISSR primers and four IRAP markers were selected. There was no variation in the molecular pattern between plant cultivation conditions for both accessions. The results confirm genetic homogeneity of the regenerated plants by somatic embryogenesis using IRAP and ISSR markers, indicating that this form of cassava plant multiplication is genetically stable.

Keywords: Tissue culture, Genetic fidelity, Molecular markers.

INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é originária do continente americano e constitui-se na principal fonte de alimentos para os países da América Latina, África, Sudeste da Ásia e Oceania (ROCA, 1984). Além do consumo humano sob a forma de farinha ou cozida, é utilizada na alimentação animal (raízes e parte aérea), na produção dos diversos subprodutos a partir da fécula da mandioca, matéria prima, em diferentes indústrias como a alimentícia e farmacêutica, bem como na indústria de cosméticos com a produção de shampoos, condicionadores e máscaras capilares. No Brasil, a mandioca é considerada o alimento mais popular desde o início da colonização. Preparada de diferentes formas, a farinha, seu principal produto, é usada por todas as camadas sociais da população. Está presente tanto em pratos cotidianos mais simples quanto em outros mais finos e elaborados, ocupando lugar de destaque na culinária nacional e regional.

Em termos de produção mundial, o Brasil ocupa o segundo lugar com 23,41 milhões de toneladas, perdendo apenas para a Nigéria que atualmente é o maior produtor com 54 milhões toneladas (FAO, 2012). No cenário nacional, ainda que cultivada em diversas regiões do país, a produção de mandioca está concentrada nos Estados do Pará (4,6 milhões de toneladas de raízes), Paraná (3,8 milhões de toneladas) e Bahia (2,2 milhões de toneladas), que juntos correspondem a 46,4% da produção brasileira (IBGE, 2012).

Devido aos variados usos tanto na culinária bem como na indústria, a mandioca adquiriu grande importância nos últimos anos, levando à necessidade de incrementar sua área de cultivo e melhorar a produtividade (SILVA et al., 2002). Entretanto, a produção de material de plantio básico sadio e em números elevados é uma das grandes limitações para a expansão e cultivo produtivo desta cultura (SOUZA et al., 2008).

Ao longo do tempo, a mandioca vem sendo propagada vegetativamente pela interferência humana, na qual, um pedaço da haste, chamado de maniva, é cortado

e plantado, reproduzindo geneticamente a planta-mãe. Entretanto, a reprodução sexuada permanece ativa, o que mantém e amplifica a variabilidade genética, possibilitando aos geneticistas a escolha de genótipos de interesse aos programas de melhoramento dessa espécie (SILVA, 2001). Neste sentido, estudos para quantificar a variabilidade genética existente entre acessos de mandioca com diferentes potenciais de interesse agrônômico, tais como potencial para consumo fresco ou indústria, teor e qualidade de amido, rendimento de raiz, bem como a seleção de genótipos que conferem adaptação a diferentes estresses abióticos e resistência a inúmeras pragas e doenças, são estratégicos para direcionar a seleção de progenitores e o uso de germoplasma.

A biotecnologia vegetal, com seu conjunto de técnicas, desde as que foram desenvolvidas em nível de biologia celular até as moleculares, tem contribuído de forma significativa para o avanço no melhoramento genético de várias culturas, permitindo ganhos não obtidos pelo melhoramento convencional. Vale destacar que essas tecnologias devem ser complementares aos métodos tradicionais.

A cultura de tecidos de plantas pode ser definida como um conjunto de técnicas, mediante as quais um explante (parte isolada de uma planta) é cultivado de forma asséptica em um meio nutritivo e sob condições controladas de temperatura e luminosidade (SOUZA et al., 2006a). Engloba um conjunto de técnicas de relevante importância, tanto para os aspectos demandados pelo melhoramento, quanto aos que buscam a melhoria da conservação do germoplasma da espécie e que é fundamental para resguardar a variabilidade genética a ser trabalhada (SANTANA et al., 2009; FOGACA et al., 2010; FAN et al., 2011; OGERO et al., 2012).

A micropropagação é uma técnica que permite a produção de plantas geneticamente idênticas e com qualidade em curto período de tempo. Apesar de requerer uma estrutura física relativamente aprimorada e métodos mais elaborados, aspectos que de certa maneira têm limitado seu emprego de forma mais globalizada, é considerada a técnica que tem apresentado maiores aplicações práticas entre todos os procedimentos que compõem a cultura de tecidos vegetais. A técnica possui diversas aplicações, destacando-se a eliminação de doenças e pragas, recuperação do vigor e da produtividade, intercâmbio e conservação *in vitro* de germoplasma (SOUZA et al., 2009).

A produção de plantas *in vitro* de mandioca pode ser realizada também por sistemas que não sejam, necessariamente, por via organogênica, como se dá com o cultivo de meristemas de uma maneira geral, mas também por meio de um processo embriogênico advindo de células somáticas e denominado, portanto, embriogênese somática. Embriogênese somática, adventícia ou assexual, é o processo pelo qual, células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (GUERRA et al., 1999).

A embriogênese somática, se eficientemente desenvolvida, pode permitir a obtenção de inúmeros propágulos a partir de um pequeno número de explantes (FILIPPI et al., 2001). Todavia, para o sucesso desta técnica três fatores básicos são considerados: o genótipo, a fonte de explante e as condições de cultivo (GUERRA et al., 1999). Além disso, para a formação de estruturas embriogênicas, são necessárias a utilização de reguladores vegetais como as auxinas, uma vez que elas estão envolvidas no processo de indução e iniciação do embrião somático (JENIK; BARTON, 2005). Dentre as auxinas, as mais utilizadas para esse objetivo estão o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram).

Na indução da embriogênese somática podem-se observar dois padrões básicos, onde o primeiro corresponde ao modelo direto no qual embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágio intermediário de calo, enquanto o segundo corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente com diferentes graus de determinação, onde estas células podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos, a exemplo das auxinas (GUERRA et al., 1999).

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático apresenta muitas características morfológicas semelhantes às do embrião zigótico. Inicialmente, ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular. Ambos passam pelos estádios de desenvolvimento pró-embriônários e embriônários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (ARNOLD et al., 2002).

A primeira descrição de um sistema para regeneração de plantas por embriogênese somática foi relatada por Steward et al. (1958), em cenoura. Atualmente, tem-se utilizado esta técnica em diferentes espécies de plantas, tais como *Araucaria angustifolia* (SANTOS et al., 2008), *Acca sellowiana* (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2009), helicônia (ULISSES et al., 2010), coco (MONTERO-CORTÉS, 2011), dentre outras.

Em mandioca, o primeiro trabalho utilizando a embriogênese somática para regenerar plantas foi realizado em 1982 por Stamp e Henshaw, que utilizaram cotilédones e lóbulos de folhas jovens como fonte de explantes. A partir daí, vários autores têm utilizado esta técnica como sistema de regeneração (FEITOSA et al., 2007; IBRAHIM et al., 2008; VIDAL, 2009; LI et al., 2010).

Vários autores conseguiram induzir embriões somáticos utilizando tanto o 2,4-D (FLETCHER et al., 2011; WONGTIEM et al., 2011) quanto o Picloram (OSÓRIO et al., 2012) em explantes de cotilédones (HANKOUA et al., 2005), meristemas (ATEHNKENG et al., 2006), gemas axilares e folhas imaturas (ROSSIN; REY, 2011).

O potencial embriogênico da mandioca parece ser dependente do genótipo, fazendo com que a regeneração de plantas por esse sistema seja possível apenas para um número limitado de cultivares ou demande ajustes para novos materiais, considerando os fatores mais determinantes.

Atehnkeng et al. (2006) estudando a interação entre concentrações de picloram (8 e 12 mg L⁻¹), genótipos (TME 8, TME 594, TME 596, SL80/40, I60142, I95/0528, I96/0016, I96/0035, I96/0860, I96/1439 Z95/0826) e tipos de explantes (lóbulos de folha e meristema) na determinação da competência embriogênica de mandioca, observaram diferenças significativas na interação genótipos x explantes. Esses autores verificaram que a capacidade desses genótipos (63,63%) em submeter-se a embriogênese é influenciada pelo explante, tendo os lóbulos de folhas apresentado melhores respostas aos tratamentos de indução.

Rossin e Rey (2011) avaliaram a competência para a embriogênese somática de oito cultivares de mandioca (T200, AR9-18, MTA116, CR25-4, CM523-7, BRA1183, MCOL2261 e SM707-17) comparada ao modelo da cultivar TMS60444 em meios de cultura contendo picloram (12 mg L⁻¹) ou 2,4-D (8 mg L⁻¹), utilizando dois tipos de explantes (gemas axilares e lóbulos de folhas imaturas). Esses autores observaram diferenças significativas entre os genótipos de mandioca para a

capacidade de formar embriões somáticos, era dependente do tipo de auxina e explantes. Em geral, gemas axilares em meio contendo picloram apresentou a maior frequência de embriões somáticos nos genótipos TMS60444, T200, MTA116, CR25-4 e CM523-7 enquanto AR9-18 teve uma maior eficiência usando lóbulos de folhas em picloram. Além disso, das oito cultivares utilizadas, cinco demonstraram capacidade de produzir embriões somáticos, embora a sua eficiência para a embriogênese somática não era tão elevada como o modelo cultivar TMS60444.

Além da dependência do genótipo como um dos fatores limitantes no sistema de regeneração de plantas, deve ser levada em consideração a variação ocasionada pela cultura de tecidos, denominada variação somaclonal, ou seja, variação fenotípica de origem genética, que se torna herdável nas gerações seguintes, ou epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material sofre, quando submetido ao cultivo *in vitro* (ILLG, 1990). O termo variação somaclonal é utilizado para designar qualquer variação originada da cultura de tecidos. As fontes de variação podem ser diversas, tais como a passagem pela fase de calo, o uso de colchicina, de raios gama, o tipo de explante, dentre outros, assim como a interação entre mais de um fator (BORDALLO et al., 2004; BAIRU et al., 2006; BAIRU et al., 2011; SANTIAGO et al., 2012).

Adicionalmente, a migração de elementos de transposição ou transposons pode induzir a ocorrência de variantes somaclonais. Elementos transponíveis são sequências de DNA móveis em um genoma que podem induzir mutações genéticas e contribuir para rearranjos do genoma (BAIRU et al., 2011). Campbell et al. (2011) demonstraram que o uso de marcadores baseados em retrotransposons pode se constituir em uma ferramenta útil e eficiente para a detecção da variação somaclonal, assim como permitir maior compreensão das causas e dessa forma auxiliar no delineamento de estratégias que possam garantir a estabilidade genética do material regenerado.

Altas taxas de variação somaclonal durante a micropropagação de muitas plantas continuam a ser um grande problema, especialmente em operações comerciais em grande escala. A detecção prévia e a eliminação de plantas fora do padrão, portanto, é essencial para reduzir perdas aos produtores. Por outro lado, a constatação eficaz de variantes também pode ser usada como uma forma de variabilidade genética para seleção de características agrônômicas úteis (BAIRU et al., 2011).

Entre os métodos utilizados para detectar variações somaclonais estão o acompanhamento visual durante o desenvolvimento das plantas, a análise citogenética, citometria de fluxo e o monitoramento mediante o uso de marcadores moleculares (ALVES et al., 2004; PRADO et al., 2010). Contudo, as características morfológicas muitas vezes são fortemente influenciadas por fatores ambientais e podem não refletir verdadeiramente a composição genética de uma planta (MANDAL et al., 2001). Já as técnicas citogenéticas exigem a elaboração de protocolos que são bastante laboriosos e demandam tempo e trabalho, ainda mais para uma grande quantidade de amostras (ABREU, 2010). Desta forma, as técnicas moleculares são valiosas ferramentas utilizadas na análise de fidelidade genética de plantas micropropagadas, já que oferecem uma resposta rápida quando comparado com outros métodos (BAIRU et al., 2011).

Os marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), retrotransposons (IRAP-*Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism* e REMAP- *Retrotransposon-microsatellite Amplified Polymorphism*), por se basearem na Reação em cadeia da polimerase (PCR), são ferramentas de fácil uso e de custo relativamente baixo quando comparados a outros marcadores, como os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (POWELL et al., 1996).

Dentre os marcadores moleculares, o ISSR destaca-se por apresentar um grande número de bandas informativas por reação, e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio de sequência de DNA para a construção do *primer* utilizado (FALEIRO, 2007), e o baixo custo da técnica, quando comparado aos AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (REDDY et al., 2002). Envolve a amplificação de segmentos de DNA delimitado por dois microssatélites invertidos. A técnica utiliza microssatélites, geralmente 16-25 pb de comprimento, como iniciadores numa única reação de PCR visando múltiplos loci genômicos para amplificar principalmente as inter-SSR sequências de tamanhos diferentes. As repetições microssatélites utilizadas como iniciadores podem ser dinucleótido, trinucleótidos, tetranucleótido ou pentanucleótido (REDDY et al., 2002).

Diversos autores têm utilizado os marcadores ISSR para avaliação da estabilidade genética de plantas provenientes de cultura de tecidos. Bhatia et al. (2009) avaliaram a fidelidade genética de 45 plantas *in vitro* de gérbera provenientes de diferentes explantes (capítulo, brotos e folhas) por meio de 32 *primers* ISSR, dos

quais 15 apresentaram bandas claras, distintas e contáveis. Contudo, não houve variação genética nos clones oriundos do capítulo e dos brotos, ao passo que, um dos clones derivados de folha apresentou alguma variação. Já Huang et al. (2009) utilizaram os marcadores ISSR para avaliar a estabilidade genética de plantas *Platanus acerifolia* micropropagadas por longo período de tempo. Dezesesseis dos 38 *primers* selecionados produziram 103 bandas distintas, onde 86 foram monomórficos em todas as 20 das plantas testadas e 17 mostraram polimorfismo de 16,5%, demonstrando que plantas micropropagadas de *P. acerifolia* é geneticamente estável.

Elementos de transposição estão presentes desde bactérias até eucariotos (BENNETZEN et al., 2000). Estes elementos compõem grande parte do genoma dos eucariotos e podem corresponder entre 50% a 80% do DNA nuclear em algumas espécies de gramíneas (FESCHOTTE et al., 2002).

Nos eucariotos, elementos de transposição estão separados em duas classes de acordo com a forma de transposição. Elementos da classe I ou retrotransposons são aqueles em que a transposição é realizada por intermédio de uma molécula de RNA, mecanismo amplamente conhecido como “copia e cola”. Enquanto que os transposons (classe II) são aqueles que se movimentam via DNA, sem intermédio de uma molécula de RNA. Este mecanismo de transposição é também conhecido como “corta e cola”. Os retrotransposon apresentam transposição duplicativa, isto é, o número de cópias do elemento aumenta após a transposição, potencializando a expansão do genoma (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007).

Os retrotransposons compreendem a classe mais comum de transposons e ocorrem em grande número de cópias em genoma de plantas. Vários desses elementos têm sido sequenciados e tem sido verificado alto grau de polimorfismos intra e interespecífico. Como as inserções de retrotransposons são irreversíveis e ocorrem ao longo de todo genoma, os marcadores baseados nessas sequencias são considerados particularmente úteis em estudos filogenéticos e mapeamento genético (FALEIRO, 2007).

Segundo Kalendar e Shulman (2006) os retrotransposons podem ser usados como marcadores, porque a sua integração cria novas junções entre o DNA genômico e as suas extremidades conservadas. Para detectar polimorfismos de inserção retrotransposon, sistemas de marcadores geralmente dependem de

amplificação por PCR entre estas extremidades e um componente de flanco de DNA genômico. Kalendar et al. (1999) desenvolveram dois métodos, o Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) e Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP), que não requerem a digestão com enzima de restrição ou a ligação para gerar as bandas marcadoras. São amplificados por PCR com um iniciador único ou com dois iniciadores e por eletroforese em gel de agarose do produto, utilizando tampões de eletroforese.

Diante do que foi exposto, este trabalho teve como objetivo a otimização dos protocolos de embriogênese somática e a detecção de variação somaclonal em plantas de mandioca regeneradas por dois sistemas de propagação, mediante o uso de marcadores moleculares ISSR e IRAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. S. de. **Monitoramento da embriogênese somática de *Carica papaya* L. por técnicas citogenéticas e de citometria de fluxo**. Viçosa, 2010. 43f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. TRINDADE, A. V. Propagação. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Eds.) **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 59-86.

ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

ATEHNKENG, J.; ADETIMIRIN, V. O.; NG, S. Y. C. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 14, p. 1324-1329, 2006.

BAIRU, M. W.; FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 347–351, 2006.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p.147–173, 2011.

BENNETZEN, J.L. Transposable element contributions to plant genome evolution. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 251–269, 2000.

BHATIA, R.; SINGH, K. P.; JHANG, T.; Sharma, T. R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 208–211, 2009.

BORDALLO, P. N.; SILVA, D. H.; MARIA, J.; CRUZ, C. D.; FONTES, E. P. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.2, p.300-304, 2004.

CAMPBELL, B. C.; LE MARE, S.; PIPERIDES, G.; Godwin, I. D. IRAP, a retrotransposon based marker system for the detection of somaclonal variation in barley. **Molecular Breeding**, v. 27, p. 193-206, 2011.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; MALDONADO, S. B.; GUERRA, M. P. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.217-224, 2009.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FAN, M.; LIU, Z.; ZHOU, L.; LIN, T.; LIU, Y.; LUO, L. Effects of plant growth regulators and saccharide on *in vitro* plant and tuberous root regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, n.1, p. 11-19, 2011.

FAO, **Statistical Database**, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Atualizado em 16/01/2013. Acesso em setembro 2013.

FEITOSA, T.; BASTOS, J. L. P.; PONTE, L. F. A.; JUCÁ, T. L.; CAMPOS, F. de A. de P. Somatic Embryogenesis in Cassava Genotypes from the Northeast of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 201-206, 2007.

FESCHOTTE, C.; ZHANG, X.; WESSLER, S. Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and their relationship with established DNA transposons. **Nature Review of Genetics**, v. 3, p. 1147–1158, 2002.

FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, v.58, p.711-716, 2001.

FLETCHER, E. K. A.; AMOAKO, T. N. E.; TWUMASI P. Effect of 2,4-D, explants type and cultivar on the callogenesis expression of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Ghana. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 9396-9401, 2011.

FOGAÇA, C. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; CORDEIRO, D. C.; CORREIA, T. D.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C.; CARGNIN, A. *In vitro* microtuberization of cassava cultivars: morphological and anatomical aspects. **Acta Botanical. Brazilian**, v. 24, n.3, p., 2010.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura**

de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 533-568.

HANKOUA, B. B.; NG, S. Y. C.; FAWOLE, J.; Puonti-KAERLAS, J.; Pillay, M.; DIXON, A. G. O. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 221-231, 2005.

HUANG, W. J.; NING, G. G.; LIU, G. F.; BAO, M. Z. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 159-163, 2009.

IBGE - **Produção Agrícola Municipal**, 2012. Disponível em <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2012_v39_br.pdf> Acesso em 21/11/2013.

IBRAHIM, A. B.; HEREDIA, F. F.; PINHEIRO, C. B.; ARAGAO, F. J. L.; CAMPOS, F. A. P. Optimization of somatic embryogenesis and selection regimes for particle bombardment of friable embryogenic callus and somatic cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 2790-2797, 2008.

ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília, DF: ABCTP/Embrapa-CNPQ, 1990. p. 287-295.

JENIK, P. D.; BARTON, M. K. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. **Development**, v. 132, p. 3577-3585, 2005.

KALENDAR, R.; GROB, T.; REGINA, M.; SUONIEMI, A.; SCHULMAN, I. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical Applied Genetics**, v. 98, p. 704-711, 1999.

KALENDAR, R.; SCHULMAN, A. H. IRAP and REMAP for retrotransposon based genotyping and fingerprinting. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2478-2484, 2006.

LI, K.; ZHU, W.; ZENG, K.; ZHANG, Z.; YE, J.; OU, W.; REHMAN, S.; HEUER, B.; CHEN, S. Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. **Proteome Science**, v. 8, p. 1-12, 2010.

MANDAL, A.; MAITI, A.; CHOWDHURY, B.; ELANCHEZHIAN, R. Isoenzyme markers in varietal identification of banana. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v. 37, p. 599-604, 2001.

MONTERO-CORTÉS, M. I.; CHAN-RODRÍGUEZ, J. L.; CORDOVA-LARA, I.; OROPEZA-SALIN, C.; SÁENZ-CARBONELL, L. Addition of benzyladenine to coconut explants cultured *in vitro* improves the formation of somatic embryos and their germination. **Agrociencia**, v. 45, p. 663-673, 2011.

OGERO, K. O.; MBURUGU, G. N.; MWANGI, M.; OMBORI, O.; ASIAN, M. N. *In vitro* micropropagation of cassava through low cost tissue culture. **Journal Agricultural Science**, v. 4, n. 3, p. 205-209, 2012.

OSÓRIO, M.; GÁMEZ, E.; MOLINA, S.; INFANTE, D. Evaluation of cassava plants generated by somatic embryogenesis in different stages of development using molecular markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1-11, 2012.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S. V.; RAFALSKI, A. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germoplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-238, 1996.

PRADO, M. J.; RODRIGUEZ, E.; REY, L.; GONZÁLEZ, M. V.; SANTOS, C.; REY, M. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, n. 1, p. 49-59, 2010.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9–17, 2002.

ROCA, W.M. Cassava. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York: Mcmillan, 1984. p. 269-301.

ROSSIN, C. B.; REY, M. E. C. Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. **South African Journal of Botany**, v. 77, p. 59-65, 2011.

SANTANA, M. A.; ROMAY, G.; MATHEUS, J.; VICENTE-VILLARDÓN, J. L.; DEMEY, J. R. A simple and low-cost strategy for micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3789-3897, 2009.

SANTIAGO, G.; REINIGERLL, L. R. S.; HANAUERL, J. G.; LOPES, S. J.; DEPRÁ, M. S. Variação somaclonal nos descritores mínimos de tubérculo em batata. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p.197-202, 2012.

SANTOS, A. L. W. dos; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; ZOGLAUER, K.; MOERSCHBACHER, B. M. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, V. 52, P. 195-199, 2008.

SILVA, R. M.; BANDEL, G.; FARALDO, M. I. F.; MARTINS, P. S. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. **Scientia Agrícola**, v.1, p. 101-07, 2001.

SILVA, M. N. da; CEREDA, M. P.; FIORINI, R. A. Multiplicação rápida de mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 187-197. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

SLOTKIN, R.K.; MARTIENSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Review of Genetics**, v. 8, p. 272–285, 2007.

SOUZA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à cultura de tecidos de plantas**. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 111-135.

SOUZA, A. da S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SILVA NETO, H. P. da. Micropropagação da mandioca mediante ápices caulinares e segmentos nodais. **Circular Técnica 88**. Embrapa. Cruz das Almas, 11p. 2008.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SILVA NETO, H. P. da S.; MENEZES, M. C.; SILVEIRA, D. G.; SANTOS, V. da S. Micropropagação da mandioca. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Eds). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 323-349.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Somatic embryogenesis in cassava. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 105, p. 183-187, 1982.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.

ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. de C.; BRITO, J. Z. de. Early Somatic Embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink Ovary Section Explants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p. 11-18, 2010.

VIDAL, Á. M. **Micropropagação e embriogênese somática em variedades cultivadas de mandioca**. Cruz das Almas, 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

WONGTIEM, P.; COURTOIS, D.; FLORIN, B.; JUCHAUX, M.; PELTIER, D.; BROUN, P.; DUCOS, J. P. Effects of cytokinins on secondary somatic embryogenesis of selected clone Rayong 9 of *Manihot esculenta* Crantz for ethanol production. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1600-1608, 2011.

CAPÍTULO 1

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM VARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)¹

¹ Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Brazilian Archives of Biology and Technology.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM VARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

RESUMO: A embriogênese somática tem sido aplicada para várias culturas e as respostas morfogênicas dependem de vários fatores, como meio de cultivo, reguladores de crescimento, espécie, cultivar, tipo e estado fisiológico do explante. Em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), a embriogênese somática vem sendo desenvolvida para várias cultivares. Entretanto, a obtenção de um sistema eficiente parece ser possível apenas para um número limitado de materiais, o que leva à necessidade de ajuste de protocolos para novas variedades. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial embriogênico de quatro acessos (BGM 116, BGM 264, BGM 576 e BGM 1282) do banco de germoplasma de mandioca a partir de calos provenientes de plantas *in vitro*. Para a indução dos calos, utilizou-se como fonte de explantes ápices caulinares e folhas imaturas cultivados em meio de cultura MS acrescido de sacarose (20 g L⁻¹) e sulfato de cobre (0,5 mg L⁻¹) e suplementado com 0, 2, 4, e 8 mg L⁻¹ de picloram na ausência ou presença de glutamina (100 mg L⁻¹). Após 21 dias foram avaliadas as seguintes variáveis, em porcentagem: explantes que formaram calo; tipo de calo formado: friável, compacto e semicompacto. Houve formação de calos em todos os tratamentos exceto naqueles sem auxina. Os calos obtidos apresentaram diferentes texturas a depender das combinações hormonais e explantes utilizados. O crescimento e multiplicação dos calos foram influenciados significativamente pela interação entre acessos de mandioca, ausência ou presença de glutamina e concentrações de picloram em ambos os explantes utilizados. A presença de embriões em diferentes estádios só foi registrada no segundo subcultivo da fase de multiplicação de calos, em três dos quatros acessos utilizados. Os embriões formados se converteram em plantas morfológicamente normais.

Palavras-chave: Auxina, Cultura de tecidos, Regeneração.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz)

ABSTRACT: The somatic embryogenesis has been applied to different crops but morphogenic responses depend on several factors such as media culture, growth regulators, species, cultivar, type and physiological status of the explant. In cassava (*Manihot esculenta* Crantz), somatic embryogenesis has been developed for several cultivars. However, an efficient system has been possible only to a limited varieties, leading to the adjustment of protocols for new varieties. Thus, this work aimed to study embryogenic potential of four accessions (BGM 116, BGM 264, BGM 576 e BGM 1282) of cassava germplasm bank. To callus induction was used apical meristems and immature leaves as explants. The MS medium supplemented with sucrose (20 g L^{-1}) and copper sulfate (0.5 mg L^{-1}) and supplemented with 0, 2, 4 and 8 mg L^{-1} picloram in the absence or presence of glutamine (100 mg L^{-1}) was used. After 21 days, the following variables were evaluated in percentage: explants that formed callus, type of callus: friable, compact and semi compact. Callus formation was observed in all treatments except those without auxin. The callus showed different textures depending on the hormonal combinations and explants. The growth and callus multiplication were significantly influenced by the interaction between cassava accessions, absence or presence of glutamine and concentrations of picloram in both explants. The presence of embryos at different stages was only recorded in the second subculture of callus multiplication phase in three of the four accessions used. Embryos formed morphologically normal plants.

Keywords: Auxin, Tissue culture, Regeneration.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é a principal fonte de carboidratos para diversos países da América Latina, África, Ásia e Oceania. Por se tratar de uma cultura rústica e com capacidade de tolerância à seca, bem como baixa exigência de nutrientes, é cultivada tanto por agricultores de subsistência como para produção em larga escala (BURNS et al., 2010).

Dentre os países produtores de mandioca no mundo, o Brasil ocupa o segundo lugar com uma produção em torno de 23,41 milhões de toneladas distribuídas em 1.703.733 ha (FAO, 2012). No Brasil, a mandioca é cultivada em todas as regiões, representando importante papel na alimentação humana e animal, como matéria-prima para inúmeros produtos industriais e na geração de emprego e de renda (CARDOSO; SOUZA, 2002). Apesar da sua importância, a cultura apresenta algumas limitações para a sua expansão e um cultivo produtivo e dentre estas pode se destacar a produção de material de plantio básico sadio e a baixa taxa de multiplicação, ambos decorrentes da sua forma de propagação que é basicamente vegetativa.

A implementação da cultura de tecidos em associação ao melhoramento genético convencional da mandioca pode melhorar sua eficiência e acelerar seus resultados. As técnicas de biologia celular podem ser utilizadas para produzir material de plantio de qualidade, sadio e garantir maior produtividade da cultura (SANTANA et al., 2009). Dentre essas técnicas, a embriogênese somática pode se constituir em um importante método de multiplicação em larga escala de plantas *in vitro*. Por outro lado, a regeneração de plantas por este sistema tem se constituído em um método que subsidia outras ferramentas biotecnológicas, a exemplo da transformação genética (LAMB et al., 2002) onde é imprescindível um sistema de regeneração para o resgate da célula transformada.

Existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática, o modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos; e o modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação (GUERRA et al., 1999).

A regeneração de plântulas de mandioca mediante a formação de embriões somáticos foi obtida pela primeira vez por Stamp e Henshaw (1982), utilizando cotilédones e lóbulos de folhas jovens. A partir daí, vários tipos de explantes têm sido utilizados para indução de embriões nesta espécie como ápices caulinares e gemas laterais (ATEHNKENG et al., 2006; SAELIM et al., 2006).

A cultura de calos de mandioca é obtida após o cultivo de explantes em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com uma auxina. Geralmente, as mais utilizadas são o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (HANKOUA et al., 2005; ROSSIN; REY, 2011) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (JOSEPH et al., 2004; FLETCHER et al., 2011). Após a fase de indução, os embriões somáticos são transferidos para meio de maturação e a regeneração em plantas é obtida após quatro semanas quando estes explantes são colocados em meio com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (HANKOUA et al., 2006).

Apesar de alguns autores descreverem a embriogênese somática como um método de propagação massal, ainda não foi realmente aplicado em mandioca para a propagação em larga escala porque a frequência de regeneração de plantas a partir de embriões somáticos de mandioca geralmente é baixa (WONGTIEM et al., 2011). Além disso, a geração de estruturas embriogênicas tem que ser otimizada para cada cultivar de mandioca, devido à forte dependência do genótipo observada na cultura (ROSSIN; REY, 2011).

Os requisitos básicos para aumentar a eficiência de regeneração em cada cultivar, se constituem principalmente, no equilíbrio entre o desenvolvimento do sistema radicular e caulinar e no ajuste da composição do meio de cultura a fim de se obter embriões somáticos morfolologicamente normais e em quantidades que justifiquem o uso da técnica. Uma etapa determinante é a de rediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial embriogênico de acessos de mandioca a partir da indução de calos de plantas *in vitro*, com vistas à regeneração de plantas para produção em larga escala ou como subsidio à outras biotecnologias.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Como material vegetal foram utilizadas plantas de mandioca dos acessos BGM 116, BGM 264, BGM 576 e BGM 1282 obtidos do Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA. Esses acessos foram selecionados pelo potencial agrônômico que possuem na região Nordeste do Brasil. Os acessos BGM 116 e BGM 264 provenientes da Bahia são utilizados para produção de farinha, enquanto os BGM 576 e BGM 1282 procedentes de Pernambuco, são utilizados para consumo humano.

Manivas provenientes de plantas adultas foram plantadas em tubetes contendo uma mistura do substrato Plantmax[®] + fibra de coco (2:1 v/v), em casa de vegetação. Aos 21 dias de cultivo, os brotos emergidos das manivas, após alcançarem 2,0 cm, foram destacados, levados ao laboratório e submetidos a um processo de desinfestação em álcool a 50% por três minutos e hipoclorito de sódio a 0,25% por 3 minutos, seguido da tripla lavagem em água destilada e autoclavada.

Após o processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar, realizou-se a retirada dos meristemas, com o auxílio de uma lupa, pinça e lâmina de bisturi. Os meristemas foram inoculados em meio contendo os sais do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de inositol, 0,02 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), 0,04 mg L⁻¹ de BAP (benzilaminopurina), 0,05 mg L⁻¹ de GA₃, (ácido giberélico), 20 g L⁻¹ de sacarose e 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®]. O meio foi ajustado a pH 5,78 e posteriormente autoclavado à temperatura de 121°C durante 20 minutos. O ambiente de crescimento dos explantes foi mantido sob temperatura de 27 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons 30 μmol m⁻²s⁻¹.

Após o estabelecimento das plantas, que compreendeu um período de 40 dias, os segmentos nodais foram transferidos para meio de multiplicação, composto por 1/3 dos macro e micronutrientes do MS, suplementado com 0,35 mg L⁻¹ de tiamina, 35 mg L⁻¹ de inositol, 0,01 mg L⁻¹ de ANA, 0,01 mg L⁻¹ de GA₃, 20 g L⁻¹ de sacarose (CIAT, 1982) e solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®]. O pH do meio e as condições de cultivo foram as mesmas da cultura acima descritas.

Foram realizados cinco subcultivos até se obter o número de plantas satisfatório para a retirada dos explantes que deveriam compor os experimentos propostos.

Indução de calos em explantes de mandioca sob diferentes concentrações de glutamina e picloram.

Ápices caulinares de aproximadamente 1,0 cm e folhas imaturas (ainda não expandidas) extraídos de plantas pré-estabelecidas *in vitro* dos acessos BGM 116, BGM 264, BGM 576 e BGM 1282, foram isolados sob condições assépticas e transferidos para placas de Petri contendo 25 mL do meio MS, acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 mg L⁻¹ de sulfato de cobre, suplementado com glutamina (0 e 100 mg L⁻¹) e picloram (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹), solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®], e pH ajustado para 5,78.

Para fins de análise estatística considerou-se separadamente cada tipo de explante, a partir de um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 x 4, quatro acessos, duas concentrações de glutamina e quatro concentrações de picloram, com três a cinco repetições por tratamento. Cada parcela experimental foi constituída por uma placa com quatro a cinco explantes para ápices e três a quatro para folhas.

Os explantes foram mantidos em ausência de luz e temperatura de 27±1°C por 21 dias, quando foram avaliadas as seguintes variáveis em porcentagens: Explantes que formaram calos (número de explantes que formaram calos /número de explantes totais x 100); natureza do calo formado: friável (células frouxamente ligadas), semicompacto (células moderadamente ligadas); compacto (células fortemente ligadas) e região do explante onde iniciou o crescimento do calo: inferior e superior. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de igualdade de proporção de Qui-quadrado a 5% de significância com o auxílio do programa SAS – *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 2004).

Crescimento e multiplicação de calos

Os calos obtidos foram subcultivados a cada 60 dias nas mesmas condições de indução, durante 180 dias. Nesta etapa registrou-se o número de calos

produzidos e a presença de embriões/calos, bem como seu estágio de desenvolvimento. Os dados referentes ao número de calos foram transformados para raiz (x) e submetidos ao teste F da análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância com o auxílio do programa SAS – *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 2004).

Maturação, germinação e conversão dos embriões somáticos em plantas

Os calos contendo embriões, independente do estágio de desenvolvimento, foram transferidos para meio de maturação constituído de sais e vitaminas de MS, suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 mg L⁻¹ de sulfato de cobre e 0,1 mg L⁻¹ de BAP (LI et al., 1998). Solidificou-se o meio de cultura 2,4 g L⁻¹ de Phytigel® e o pH ajustado para 5,78 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento na presença de luz, a fim de estimular o seu completo desenvolvimento.

Para a germinação, após 12 semanas em meio de maturação, fragmentos de calos com embriões foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS, acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 mg L⁻¹ de sulfato de cobre, suplementado com 0,4 mg L⁻¹ de BAP e solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel® (ZHANG et al., 2000), permanecendo nessas condições por pelo menos quatro semanas quando foram registrados o número de plântulas obtidas. Posteriormente, essas plântulas foram transferidas para meio de multiplicação e alongamento de mandioca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independente da fonte de explante (ápice ou folha) o início do intumescimento foi registrado a partir do décimo dia de cultivo. Tanto em ápices caulinares, como em folhas imaturas, o crescimento inicial do calo nos diferentes acessos, se deu preferencialmente na região abaxial, ou seja, a região de corte do explante (Figuras 1A e 1B).

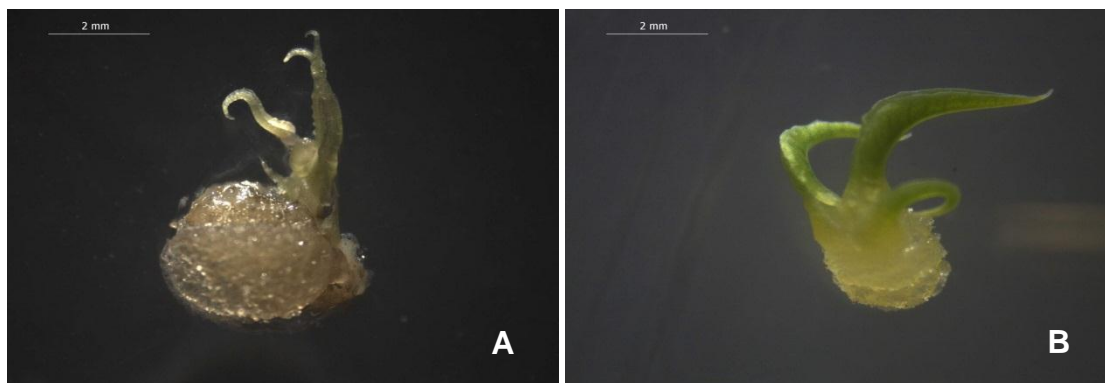


Figura 1. Indução de calos em explantes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). A- Ápice caulinar evidenciando o crescimento inicial do calo na base do explante; B- Folhas imaturas com calo formado na base do explante.

Houve diferença na formação de calo entre os acessos, mas não entre os explantes, já como resultado das diferentes expressões morfogênicas, que refletem maior ou menor aptidão de cada genótipo em responder às condições estabelecidas (dados não apresentados). Nessa etapa inicial, a maior porcentagem de explantes com crescimento foi observada no BGM 1282 em contraste com o BGM 576, com baixa formação de calos em qualquer das situações apresentadas. Os outros dois acessos apresentaram resultados similares entre eles (Tabela 1).

A formação de calos, propriamente dita, foi registrada após 21 dias de cultivo com exceção do tratamento controle, demonstrando a forte dependência de fonte exógena de fitorreguladores para ativação, desdiferenciação e divisão celular nos explantes. A presença de auxinas, principalmente, é necessária para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (GUERRA et al., 1999).

Uma avaliação referente ao total de explantes que formaram calos em cada acesso mostrou que o BGM 1282 apresentou maior potencial quando comparado aos demais e principalmente com o BGM 576, o qual teve presença de calos em apenas 11,69% dos explantes provenientes de folhas. O BGM 116 e o BGM 264 se comportaram de forma similar e independente da presença ou ausência de glutamina (Tabela 1).

Para os ápices a presença de glutamina no meio de cultura favoreceu apenas o crescimento de calos no acesso BGM 1282, sendo que em folhas a presença da glutamina melhorou o percentual de calos para esse mesmo acesso e para o BGM 576 (Tabela 1).

Tabela 1. Formação de calos em explantes de mandioca em função dos acessos e glutamina.

Acesso	Glutamina (mg L ⁻¹)		Total
	0	100	
Ápice			
BGM 116	38 (12,26%)	35 (11,29%)	73 (23,55%)
BGM 264	39 (12,58%)	35 (11,29%)	74 (23,87%)
BGM 576	22 (7,10%)	22 (7,10%)	44 (14,19%)
BGM 1282	56 (18,06%)	63 (20,32%)	119 (38,39%)
Total	155 (50,00%)	155 (50,00%)	310 (100,00%)
χ^2			0,75 ^{ns}
Folha			
BGM 116	23 (14,94%)	19 (12,34%)	42 (27,27%)
BGM 264	19 (12,34%)	13 (8,44%)	32 (20,78%)
BGM 576	5 (3,25%)	13 (8,44%)	18 (11,69%)
BGM 1282	27 (17,53%)	35 (22,73%)	62 (40,26%)
Total	74 (48,05%)	80 (51,95%)	154 (100,00%)
χ^2			5,87 ^{ns}

^{ns} não significativo a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

A glutamina tem sido frequentemente utilizada durante o estabelecimento e a manutenção de culturas de células e tecidos (GERDAKANEH et al., 2011; SHAHSAVARI, 2011; MARIASHIBU et al., 2013). Combinada com outras fontes nitrogenadas tem proporcionado resultados satisfatórios na divisão e proliferação celular dos calos provenientes de tecidos foliares em *Caesalpinia echinata* Lam. (WERNER et al., 2010). Pescador et al. (2012) analisaram os níveis endógenos de glutamina durante a embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana*, revelando que os níveis endógenos deste aminoácido foram semelhantes durante a embriogênese zigótica e somática e que sua absorção nas primeiras 2 h de incubação evidencia sua importância como fonte de N durante a morfogênese de embriões somáticos e zigóticos.

Embora a glutamina influencie na formação de embriões somáticos, neste trabalho, os resultados não mostraram efeito prejudicial deste aminoácido, muito menos algum efeito fundamental para o desenvolvimento dos calos. Já o efeito do picloram na formação de calos dos diferentes acessos foi determinante para a formação de calos, como pode ser confirmado pelo tratamento controle, onde não foi adicionado picloram e não houve a formação de calo (Tabela 2).

Tabela 2. Formação de calos em explantes de mandioca em função dos acessos e picloram.

Acesso	Picloram (mg L ⁻¹)				Total
	0	2	4	8	
Ápice					
BGM 116	0 (0,00%)	28 (9,03%)	23 (7,42%)	22 (7,10%)	73 (23,55%)
BGM 264	0 (0,00%)	25 (8,06%)	22 (7,10%)	27 (8,71%)	74 (23,87%)
BGM 576	0 (0,00%)	14 (4,52%)	13 (4,19%)	17 (5,48%)	44 (14,19%)
BGM 1282	0 (0,00%)	47(15,16%)	41 (13,23%)	31 (10,00%)	119 (38,39%)
Total	0 (0,00%)	114 (36,77%)	99 (31,94%)	97 (31,29%)	310 (100,00%)
χ^2					3,67 ^{ns}
Folha					
BGM 116	0 (0,00%)	13 (8,44%)	13 (8,44%)	16 (10,39%)	42 (27,27%)
BGM 264	0 (0,00%)	9 (5,84%)	13 (8,44%)	10 (6,49%)	32 (20,78%)
BGM 576	0 (0,00%)	6 (3,90%)	5 (3,25%)	7 (4,55%)	18 (11,69%)
BGM 1282	0 (0,00%)	19 (12,34%)	22 (14,29%)	21 (13,64%)	62 (40,26%)
Total	0 (0,00%)	47(30,52%)	53(34,42%)	54(35,06%)	154 (100,00%)
χ^2					1,21 ^{ns}

^{ns}não significativo a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

O efeito das diferentes concentrações de picloram sobre os ápices de diferentes acessos mostraram, de uma maneira geral, resultados mais favoráveis quando se utilizou 2 mg L⁻¹ de picloram do que as doses mais elevadas, com exceção do BGM 576. Os baixos valores apresentados por esse acesso pode ser um indicativo de que neste caso sejam necessárias concentrações mais elevadas deste regulador, acima das 8 mg L⁻¹ proposta no trabalho.

Já para as folhas, a concentração de 4 mg L⁻¹ favoreceu maior número de explantes com formação de calos para BGM 264 e BGM 1282, enquanto para os outros acessos a utilização de 8 mg L⁻¹ de picloram proporcionou os melhores resultados.

Assim com este trabalho, o efeito de diferentes tipos de explante sobre a eficiência da embriogênese somática ainda é objeto de estudo para diferentes espécies, como a imbuia, *Ocotea porosa* (PELEGRINI, 2012), o eucalipto (PRAKASH; GURUMURTHI, 2010), o *Cymbopogon pendulus* (BHATTACHARYA et al., 2010), aveia (BISPO et al., 2007), dentre outras espécies de destaque.

Monja-Mio e Robert (2013) descreveram um protocolo para indução de embriogênese somática de genótipos de *Agave fourcroydes* Lem., utilizando dois tipos de explantes, caule e tecido foliar cultivados em diferentes auxinas. Dentre os

explantes, os segmentos de tecidos finos cortados transversalmente a partir de caules de plantas cultivadas *in vitro* apresentaram melhor resposta embriogênica. Enquanto Bhagya et al. (2013), utilizando caule e folha como fonte de explantes para a regeneração de mudas de *Justicia gendarussa* Burm. f. via embriogênese somática, obtiveram êxito na regeneração de plantas em ambos os explantes utilizados.

Essas diferenças encontradas entre os explantes na fase de crescimento do calo, propriamente dita, se devem principalmente, às diferenças que já são intrínsecas ao explante, sua origem, a determinação e a capacidade que cada tipo de explante possui de formar células ou grupos de células competentes para responder às condições estabelecidas e aos efeitos estimulatórios (KERBAUY, 1999).

No caso de mandioca, resultados promissores com folhas imaturas ou gemas axilares (ROSSIN; REY, 2011) já foram registrados, deixando evidente, mais uma vez que o êxito obtido é fortemente dependente, tanto do genótipo, quanto dos explantes estabelecidos. Saelim et al. (2006) utilizaram três fontes de explantes (gema apical, lateral e folhas jovens) cultivados em meio contendo diferentes reguladores (picloram, dicamba e 2,4-D nas concentrações 6 ou 12 mg L⁻¹) na indução de embriões somáticos em mandioca (cultivar KU 50). Para a maioria dos reguladores e concentrações (exceto com 6 mg L⁻¹ de picloram) os explantes foliares apresentaram maior frequência de indução de embriões. Enquanto Atehnkeng et al. (2006), estudando a interação entre concentrações de picloram (8 e 12 mg L⁻¹), genótipos (TME 8, TME 594, TME 596, SL80/40, I60142, I95/0528, I96/0016, I96/0035, I96/0860, I96/1439 Z95/0826) e tipos de explantes (lóbulo de folha e meristema) na determinação da competência embriogênica de mandioca, observaram diferenças significativas na interação genótipos x explantes. Esses autores verificaram que os lóbulos de folhas apresentaram melhores respostas aos tratamentos de indução.

O estudo a respeito do tipo de textura, coloração e outros aspectos morfológicos que o calo apresenta permite um conhecimento sobre as potencialidades de cada tipo de estrutura e gera subsídios para a aplicação do protocolo para outros genótipos, indicando, dessa forma, qual o tipo de calo que é mais embriogênico e o que se deve buscar para aquela espécie. Magalhães et al. (2006) avaliaram 15 genótipos de batata doce possível à embriogênese somática, a

partir de explantes de ápices caulinares com um ou dois primórdios foliares, em meio contendo a auxina 2,4-D. Esses autores observaram que os calos embriogênicos apresentaram a coloração amarelo claro, textura compacta e granular, enquanto que os calos não embriogênicos apresentaram coloração hialina e consistência friável.

Neste trabalho foram registrados três tipos de calos: friáveis, semicompactos e compactos (Figuras 2A, 2B e 2C, respectivamente). Em calos oriundos de ápices, em sua maioria foram semicompactos e friáveis e a presença da glutamina não apresentou efeito significativo e determinante para induzir um tipo ou outro de calo. No caso dos calos oriundos de folhas, praticamente não houve formação de calos compactos, apresentando maior frequência de calos friáveis e, ao contrário do que foi registrado com os ápices, a glutamina induz maior formação de estruturas friáveis (Tabela 3).



Figura 2. Tipos de calo formados em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): A- Calo friável; B- Calo semicompacto e C- Calo compacto.

Tabela 3. Tipos de calos em explantes de mandioca em função de glutamina, considerando todos os acessos.

Tipos de calos	Glutamina (mg L ⁻¹)		Total	χ^2
	0	100		
Ápice				
Semicompacto	74 (23,87%)	66 (21,29%)	140 (45,16%)	0,58 ^{ns}
Compacto	22 (7,10%)	23 (7,42%)	45 (14,52%)	0,02 ^{ns}
Friável	59 (19,03%)	66 (21,29%)	125 (40,32%)	0,39 ^{ns}
Total	155 (50,00%)	155 (50,00%)	310 (100,00%)	
Folha				
Semicompacto	37 (24,03%)	30 (19,48%)	67 (43,51%)	0,73 ^{ns}
Compacto	0 (0,00%)	2 (1,30%)	2 (1,30%)	-
Friável	37 (24,03%)	48 (31,17%)	85 (55,19%)	1,42 ^{ns}
Total	74 (48,05%)	80 (51,95%)	154 (100,00%)	

^{ns}não significativo a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

Em relação às concentrações de picloram, frequência superior de calos friáveis foi obtida com 2 mg L⁻¹, tanto para ápices quanto para folhas. As concentrações mais elevadas, de forma geral, favoreceram a formação de calos semicompactos em ambos os tipos de explante (Tabela 4). Para Magalhães et al. (2006) as variações de formação de calos embriogênicos em um mesmo tratamento, são devido aos gradientes hormonais presentes na planta e dentre as plantas usadas como fontes de explantes.

Tabela 4. Tipos de calos em função de picloram considerando todos os acessos.

Tipos de calos	Picloram (mg L ⁻¹)			Total	χ^2
	2	4	8		
Ápice					
Semicompacto	45 (14,52%)	54 (17,42%)	41 (13,23%)	140 (45,16%)	2,17 ^{ns}
Compacto	17 (5,48%)	11 (3,55%)	17 (5,48%)	45 (14,52%)	1,60 ^{ns}
Friável	52 (16,77%)	34 (10,97%)	39 (12,58%)	125 (40,32%)	3,33 ^{ns}
Total	114 (36,77%)	99 (31,94%)	97 (31,29%)	310 (100,00%)	
Folha					
Semicompacto	10 (6,49%)	27 (17,53%)	30 (19,48%)	67 (43,51%)	10,42 ^{**}
Compacto	1 (0,65%)	1 (0,65%)	0 (0,00%)	2 (1,30%)	0,00 ^{ns}
Friável	36 (23,38%)	25 (16,23%)	24 (15,58%)	85 (55,19%)	3,13 ^{ns}
Total	47 (30,52%)	53 (34,42%)	54 (35,06%)	154 (100,00%)	

^{**} significativo a 1% de significância pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). ^{ns} não significativo a 5% de significância.

O maior potencial embriogênico de calos friáveis vem sendo registrado para várias espécies, com destaque para milho (FERNANDES et al., 2008), algodão (SILVA et al., 2009), café (MACIEL et al., 2003; SILVA et al., 2009) e mesmo mandioca (HANKOUA et al., 2006; BULL et al., 2009).

Como o BGM 1282 mostrou maior frequência na formação de calos desde as etapas iniciais decidiu-se fazer o estudo das frequências percentuais dos tipos de calo para esse acesso a fim de fazer a correlação futura com a multiplicação dos calos e com a capacidade de formar embriões normais.

Para este genótipo, tanto em ápice, quanto em folha ($p < 0,05$), maior frequência de calos friáveis foi registrada, assim como o efeito da adição de glutamina para a formação deste tipo de calo foi significativa em ambos os explantes. Esse efeito, que estava diluído quando se avaliou os genótipos em conjunto aparece de forma marcante para esse genótipo. Em folhas, adicionando-se

100 mg L⁻¹ de glutamina ao meio de cultura obteve-se uma frequência de 48,44% de explantes com calos friáveis (Tabela 5).

Tabela 5. Tipos de calos em explantes de mandioca em função de glutamina para o acesso BGM 1282.

Tipos de calos	Glutamina (mg L ⁻¹)		Total	χ^2
	0	100		
Ápice				
Semicompacto	27 (22,8%)	24 (20,34%)	51 (43,22%)	0,18 ^{ns}
Compacto	4 (3,39%)	1 (0,85%)	5 (4,24%)	1,80 ^{ns}
Friável	25 (21,19%)	37 (31,36%)	62 (52,54%)	2,32 ^{ns}
Total	56 (47,46%)	62 (52,54%)	118 (100,00%)	
Folha				
Semicompacto	10 (15,63%)	4 (6,25%)	14 (21,88%)	2,57 ^{ns}
Compacto	0 (0,00%)	2 (3,13%)	2 (3,13%)	-
Friável	17 (26,56%)	31 (48,44%)	48 (75,00%)	4,08*
Total	27 (42,19%)	37 (57,81%)	64 (100,00%)	

*significativo a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). ^{ns}não significativo a 5% de significância.

No que se refere às concentrações de picloram para os tipos de calos formados no BGM 1282, a adição de 2 mg L⁻¹ ao meio de cultura favoreceu maior formação de calos friáveis, tanto em ápices, quanto em folhas, ainda que nas folhas a concentração de 4 mg L⁻¹ foi igualmente significativa para formação desse tipo de calo (Tabela 6).

Tabela 6. Tipos de calos em explantes de mandioca em função de picloram para o acesso BGM 1282.

Tipos de calos	Picloram (mg L ⁻¹)			Total	χ^2
	2	4	8		
Ápice					
Semicompacto	19 (16,10%)	20 (16,95%)	12 (10,17%)	51 (43,22%)	2,24 ^{ns}
Compacto	1 (0,85%)	3 (2,54%)	1 (0,85%)	5 (4,24%)	1,60 ^{ns}
Friável	26 (22,03%)	19 (16,10%)	17 (14,41%)	62 (52,54%)	2,16 ^{ns}
Total	46 (38,98%)	42 (35,59%)	30 (25,42%)	118 (100,00%)	
Folha					
Semicompacto	0 (0,00%)	4 (6,25%)	10 (15,63%)	14 (21,88%)	2,57 ^{ns}
Compacto	1 (1,56%)	1 (1,56%)	0 (0,00%)	2 (3,13%)	-
Friável	19 (29,69%)	18 (28,13%)	11 (17,19%)	48 (75,00%)	2,38 ^{ns}
Total	20 (31,25%)	23 (35,94%)	21 (32,81%)	64 (100,00%)	

^{ns}não significativo a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado.

Crescimento e multiplicação de calos

O crescimento dos calos está relacionado com sua multiplicação, já que esta se dá pela fragmentação do calo em partes iguais e seu subcultivo em meio fresco.

A proliferação de calos oriundos de ápices caulinares foi influenciada significativamente pelas interações acessos de mandioca x ausência ou presença de glutamina no primeiro e segundo subcultivo, bem como acessos de mandioca x concentrações de picloram, nos três subcultivos.

O efeito da presença de glutamina no meio de cultivo foi mais marcante para o acesso BGM 116, tanto no primeiro quanto no segundo subcultivo, aumentando significativamente o número de calos. Já para o BGM 576, ainda que no primeiro subcultivo a ausência de glutamina apresentou melhores resultados, no segundo subcultivo não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a ausência ou presença do aminoácido no meio de cultura. Para os demais acessos, considerando os resultados do segundo subcultivo, a adição de glutamina não favoreceu ao crescimento de calos, e, portanto a multiplicação (Tabela 7). O nitrogênio está associado ao controle do crescimento, diferenciação e morfogênese, podendo ser fornecido sob a forma de amônio, nitrato ou aminoácidos, dentre eles a glutamina. Segundo Lakshmanan e Taji (2000) a combinação dessas fontes nitrogenadas tem proporcionado bons resultados na organogênese e morfogênese *in vitro*. Werner et al. (2010), testando diferentes fontes nitrogenadas na regulação da calogênese do Pau-brasil, observaram que a glutamina foi uma das fontes nitrogenadas mais importante na promoção da divisão celular.

Tabela 7. Efeito da glutamina no número médio de calos oriundos de ápices caulinares de quatro acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), durante dois subcultivos.

Acesso	1º Subcultivo		2º Subcultivo	
	Glutamina (mg L ⁻¹)		Glutamina (mg L ⁻¹)	
	0	100	0	100
BGM 116	3,46 bB*	4,43 aA	5,15 bB	7,90 aA
BGM 264	3,68 abA	3,79 abA	4,74 bA	5,84 aA
BGM 576	4,90 aA	3,51 bcB	7,13 aA	6,63 aA
BGM 1282	2,41 cB	3,03 cA	3,14 cA	3,96 bA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diferenças significativas entre acessos de mandioca e concentrações de picloram foram observadas na produção de calos nos três subcultivos realizados. No primeiro subcultivo, o efeito das concentrações de picloram só foram observadas nos acessos BGM 116 e BGM 1282, com melhores resultados registrados na concentração de 2 mg L⁻¹. Por outro lado, dentro de cada concentração da auxina e em todos os subcultivos houve grande variação entre os acessos avaliados, sendo que segundo e terceiro subcultivos a concentração de 2 mg L⁻¹ de picloram foi a mais eficiente para os acessos BGM 116 e BGM 576, enquanto que para o acesso BGM 1282 os resultados não diferiram entre as concentrações tanto no segundo quanto terceiro subcultivos. Já o acesso BGM 264, considerando os três subcultivos, respondeu melhor nas concentrações mais elevadas (Tabela 8).

Comparando os resultados obtidos nestes três subcultivos com as taxas de formação de calos registradas na etapa inicial do trabalho, vale destacar o comportamento do BGM 576, que na primeira fase apresentou menor frequência de ápices que formaram calo, mas na etapa de multiplicação obteve as melhores taxas nos dois últimos subcultivos juntamente com o BGM 116.

Tabela 8. Efeito do picloram no número médio de calos oriundos de ápices caulinares de quatro acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), durante três subcultivos.

1º Subcultivo			
Acesso	Picloram (mg L ⁻¹)		
	2	4	8
BGM 116	4,47 aA	3,97 Aab	3,40 aB
BGM 264	3,13 bA	4,15 aA	3,92 aA
BGM 576	4,29 aA	4,13 aA	4,20 aA
BGM 1282	3,27 bA	2,18 bB	2,70 bB
2º Subcultivo			
Acesso	Picloram (mg L ⁻¹)		
	2	4	8
BGM 116	7,41 aA	5,92 aB	6,23 aAB
BGM 264	3,35 bB	6,62 aA	5,89 aA
BGM 576	7,45 aA	6,60 aA	6,60 aA
BGM 1282	3,66 bA	3,28 bA	3,70 bA
3º Subcultivo			
Acesso	Picloram (mg L ⁻¹)		
	2	4	8
BGM 116	12,11 aA	9,26 aB	8,32 aB
BGM 264	4,59 bB	9,63 aA	7,59 aA
BGM 576	11,05 aA	8,80 aA	8,80 aA
BGM 1282	5,08 bA	5,61 bA	5,12 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com exceção do BGM 264 a concentração de 2 mg L⁻¹ de picloram é a mais recomendada, já que, ou apresentou resultado superior, quando comparada com as outras, caso do BGM 116 ou teve o mesmo desempenho, como observado nos outros acessos.

Em relação ao crescimento dos calos provenientes de explantes foliares os dados revelaram que houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os três fatores avaliados (acesso, ausência ou presença de glutamina e concentrações de picloram) nos três períodos de avaliação.

Uma vez que a genótipo-dependência é marcante em mandioca, a discussão feita por acessos contribui mais para o ajuste do protocolo. Os resultados obtidos para o BGM 116 mostraram uma interação entre a presença de glutamina e a concentração de 4 mg L⁻¹ de picloram nos três subcultivos, ainda que ao final do terceiro subcultivo não tenham sido registradas diferenças significativas entre as três concentrações, quando se adicionou a glutamina ao meio de cultura, favorecendo então a recomendação de 2 mg L⁻¹ de picloram para esse acesso (Tabela 9).

Já para o BGM 264, a presença de glutamina tem um efeito significativo nos dois primeiros subcultivos, principalmente quando combinada com as concentrações mais elevadas (4 mg L⁻¹ e 8 mg L⁻¹), promovendo maior crescimento e multiplicação celular. Como ao final do terceiro subcultivo não há diferença entre as concentrações de 4 mg L⁻¹ e 8 mg L⁻¹, a mais baixa pode ser recomendada.

Quanto ao BGM 576, não houve influência da glutamina em nenhum dos subcultivos, apenas do picloram nas concentrações mais elevadas (Tabela 9). Este acesso que foi o que menos respondeu na fase de indução, apresentou um desempenho melhor na fase de multiplicação, principalmente nas concentrações mais elevadas de picloram. Finalmente o BGM 1282 apresentou um comportamento similar ao BGM 116 com a mesma recomendação.

Comparando-se os quatro acessos no terceiro subcultivo, o comportamento em relação à influência dos fatores estudados é bastante similar e apesar das diferenças nas taxas de multiplicação, com exceção do BGM 264, o uso de 2 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹ de glutamina parece ser o recomendado. Neste trabalho, ainda que o mecanismo de ação dos fatores avaliados sobre os tecidos tenha sido semelhante, a

resposta foi diferenciada, provavelmente em função das diferenças na aquisição de competência celular de cada genótipo. As respostas na indução da embriogênese em mandioca, na maioria das vezes é genótipo-dependente (RAEMAKERS et al., 2000; OGBURIA, 2003; FLETCHER et al., 2011). Essa dependência leva à necessidade de se estabelecer protocolos específicos.

Tabela 9. Efeito da glutamina e picloram no número médio de calos oriundos de folhas imaturas de quatro acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), durante três subcultivos.

		1º Subcultivo							
		BGM 116		BGM 264		BGM 576		BGM 1282	
		Glutamina (mg L ⁻¹)							
Picloram (mg L ⁻¹)		0	100	0	100	0	100	0	100
2		5,86Aa	5,17bA	4,29aA	1,60cB	1,89bA	3,00aA	3,86aB	6,25abA
4		2,75bB	7,43aA	1,50bB	4,25bA	4,89aA	4,33aA	4,67aA	4,40bA
8		3,22bA	4,88bA	4,13aB	6,22aA	3,89aA	4,56aA	6,14aA	7,75aA
		2º Subcultivo							
		BGM 116		BGM 264		BGM 576		BGM 1282	
		Glutamina (mg L ⁻¹)							
Picloram (mg L ⁻¹)		0	100	0	100	0	100	0	100
2		9,14aA	7,33bA	5,43aA	2,20cB	2,78bA	4,50aA	4,57aA	7,25aA
4		7,33abB	13,29aA	3,50aA	6,63bA	6,44aA	9,00aA	7,00aA	4,38bB
8		6,11bA	7,75bA	5,43aB	10,22aA	5,00abA	7,33aA	6,67aA	10,38aA
		3º Subcultivo							
		BGM 116		BGM 264		BGM 576		BGM 1282	
		Glutamina (mg L ⁻¹)							
Picloram (mg L ⁻¹)		0	100	0	100	0	100	0	100
2		15,71 aA	11,33aA	7,50aA	3,00bB	3,11bA	5,25aA	5,00bA	9,00bA
4		8,00 bB	15,71aA	5,00aB	9,29aA	8,11aA	11,50aA	10,33aA	7,00bA
8		10,56 bA	14,25aA	7,00aB	12,00aA	9,00aA	10,33aA	11,33aA	14,00aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Formação de embriões, maturação, germinação e conversão dos embriões somáticos em plantas.

A presença de embriões somáticos só foi registrada após 150 dias, na fase de multiplicação de calos, durante o segundo subcultivo. Nesta fase, a frequência de embriogênese somática, expressa como uma porcentagem de calos contendo embriões foi registrada nos acessos BGM 116, BGM 264 e BGM 1282, atingindo valor máximo de 31,81% (Tabela 10), sobretudo, no acesso BGM 116. No acesso

BGM 576 não houve formação de embrião independente do período de cultivo em que se encontrava.

Houve resposta diferenciada na obtenção de embriões dos diferentes acessos em função dos tratamentos de indução. No acesso BGM 116 foi registrada a presença de embriões em calos provenientes de ambos os explantes utilizados, entretanto, os tratamentos na resposta à embriogênese foram diferenciados. Em calos provenientes de ápice caulinar houve formação de embrião quando estes foram cultivados em meio contendo 8 mg L^{-1} de picloram tanto na presença quanto ausência da glutamina. Da mesma forma, os calos oriundos de explantes foliares originaram embriões quando cultivados em meio na presença ou ausência de glutamina, porém, com 4 mg L^{-1} de picloram.

No acesso do BGM 264 a formação de embriões foi registrada apenas em calos oriundos de ápice caulinar quando cultivados na presença de glutamina acrescidos de 4 ou 8 mg L^{-1} de picloram. Já o acesso BGM 1282 só formou embrião nos calos provenientes de explantes foliares cultivados em meio contendo glutamina suplementado com 8 mg L^{-1} de picloram (Tabela 10).

Tabela 10. Total de calos (TC), porcentagem de calos contendo embriões (PCE), total de embriões (TE) e número de plantas regeneradas (PR) de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) sob diferentes concentrações de glutamina e picloram.

BGM 116								
Explante	Indução		Maturação	Germinação	Conversão			
	Glutamina (mg L^{-1})	Picloram (mg L^{-1})			TC	PCE	TE	PR
Ápice	0	8	MS + 0,1 mg L^{-1} de BAP	MS + 0,4 mg L^{-1} de BAP	68	7,5	18	5
Ápice	100	8			65	23	48	0
Folha	0	4			22	31,8	32	8
Folha	100	4			93	8,6	24	19

BGM 264								
Explante	Indução		Maturação	Germinação	Conversão			
	Glutamina (mg L^{-1})	Picloram (mg L^{-1})			TC	PCE	TE	PR
Ápice	100	4	MS + 0,1 mg L^{-1} de BAP	MS + 0,4 mg L^{-1} de BAP	69	4,3	8	0
Ápice	100	8			50	8,0	14	0

BGM 1282								
Explante	Indução		Maturação	Germinação	Conversão			
	Glutamina (mg L^{-1})	Picloram (mg L^{-1})			TC	PCE	TE	PR
Ápice	100	8	MS + 0,1 mg L^{-1} de BAP	MS + 0,4 mg L^{-1} de BAP	83	14,4	45	23

Em mandioca, o picloram é muito utilizado para indução da embriogênese somática. Contudo, a capacidade desse regulador em promover a indução da embriogênese somática parece ser determinada mais pelo genótipo que pela própria auxina. Li et al. (2012) induziram embriões somáticos primários em gemas axilares de quatro cultivares de mandioca da China. Entretanto, apenas três cultivares mantiveram a atividade de embriões somáticos, evidenciando o efeito do genótipo na regulação da embriogênese somática.

Os resultados obtidos quanto à formação de embriões deixam evidente a dificuldade de se desenvolver um protocolo básico para diferentes variedades, com respostas tão diferenciadas. Essas diferenças de comportamento em cultivares de mandioca também foram observadas por Chetty et al. (2013) que adaptaram o protocolo quanto ao período de incubação e de ciclos no escuro para a cultivar T200 para obtenção de calos embriogênicos friáveis (CEF), quando comparada a cultivar modelo TMS 60444, deixando claro o efeito do genótipo no desenvolvimento de CEF's como fator limitante na produção de plantas transgênicas.

Foram registrados embriões com diferentes estádios de desenvolvimento (globular, torpedo e cotiledonar), ainda na fase de multiplicação, contudo, a maioria era cotiledonar e apresentou coloração do esbranquiçado ao amarelado (Figura 3A-C).

A resposta ao meio de maturação foi observada após uma semana da transferência, onde as estruturas apresentavam coloração esverdeada e tornavam-se mais densa à medida que cresciam (Figuras 3D-E). Dos acessos que formaram embriões apenas o BGM 264 não completou o desenvolvimento dos embriões, pois na passagem para o meio de maturação algumas das estruturas contaminaram por bactérias ou não ficaram verdes. Assim, não foi possível estimular o desenvolvimento completo dos embriões somáticos além desse estádio, contudo, ficou demonstrado o potencial morfogenético de ápices caulinares do referido acesso.

A germinação dos embriões somáticos iniciou-se após quatro semanas de cultivo (Figura 3F). Dentre os acessos que formaram embriões, o BGM 1282 obteve maior número (23) de plantas regeneradas, enquanto no acesso BGM 116 os melhores resultados foram obtidos quando os embriões originados de explantes foliares foram induzidos em meio contendo 4 mg L^{-1} de picloram e suplementado com glutamina, na fase de indução (Tabela 10).

As plantas transferidas para o meio de micropropagação desenvolveram-se normalmente, enraizando e alongando de forma satisfatória (Figura 3G). Essas plantas apresentaram todas as características necessárias para entrarem na rota de multiplicação por meio do seccionamento e obtenção de microestacas, que são subcultivadas para proceder à micropropagação da variedade.

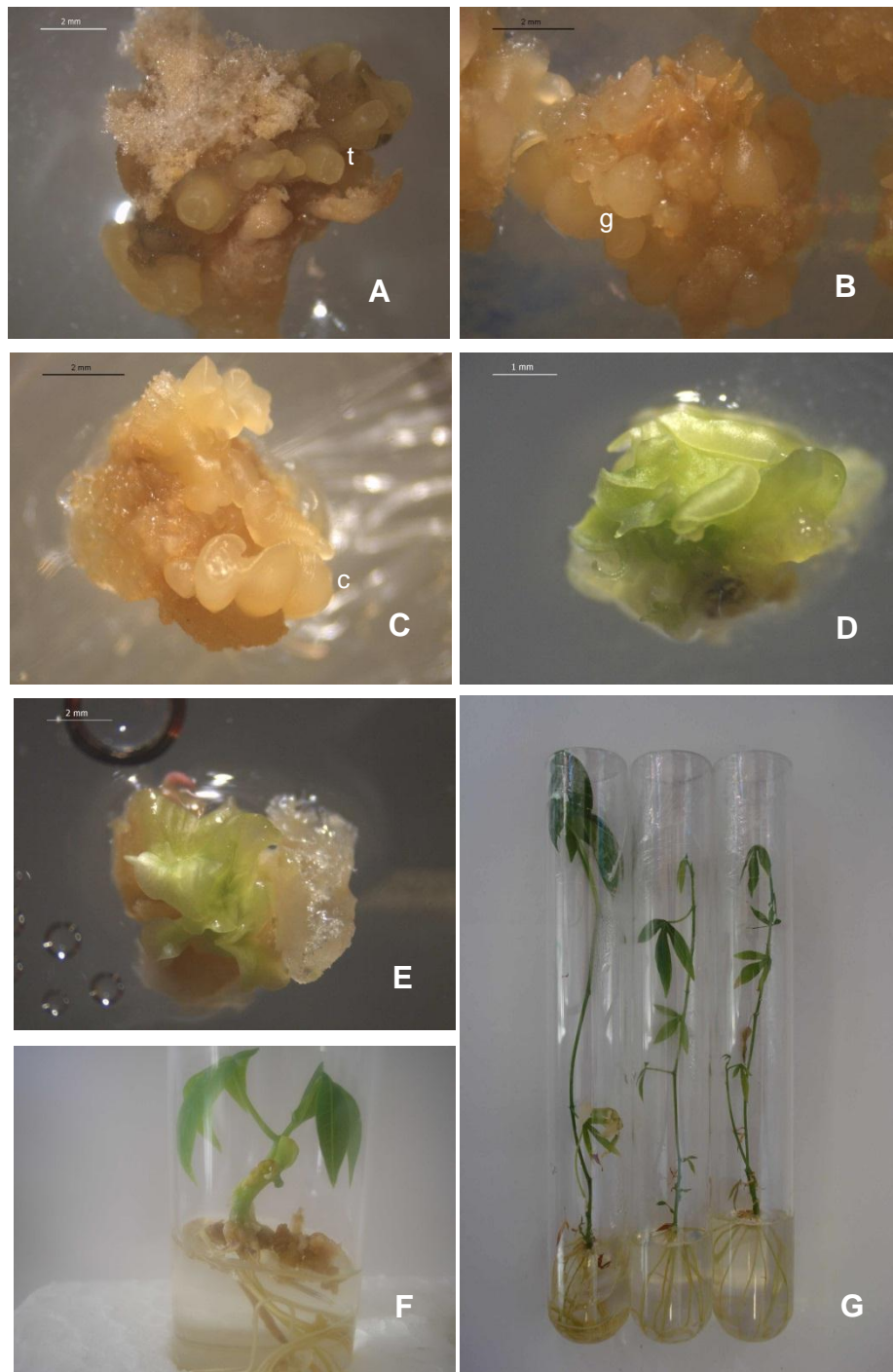


Figura 3. Embriogênese somática e regeneração de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). A-C- Embriões somáticos em meio de indução com diferentes

estádios de desenvolvimento, globular (g), torpedo (t) e cotiledonar (c); D-E – Embriões em meio de maturação; F- Planta formada em meio de germinação; G- Planta desenvolvida em meio de multiplicação.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a possibilidade de regenerar plantas de mandioca por meio da embriogênese somática, especialmente os genótipos dos acessos BGM 116 e BGM 1282. Contudo, a eficácia de regeneração e principalmente de multiplicação ainda é baixa quando comparada à regeneração e às taxas de multiplicação por cultivo de meristemas, que atualmente é o método mais utilizado na propagação *in vitro* da mandioca.

Ficou evidente em todas as etapas deste trabalho, a forte influência do genótipo para expressar o potencial embriogênico em mandioca, levando à necessidade de novas estratégias que poderão aumentar a eficiência dos protocolos de embriogênese, tais como, uso do meio GD (GRESSHOFF; DOY, 1974) na indução e manutenção de calos embriogênicos friáveis (CHETTY et al., 2013), ou até mesmo outras auxinas como ácido naftalenoacético (BRUNETTA et al., 2006) e substâncias como cloreto de cálcio, já utilizado por pesquisadores chineses (LI et al., 2009) na indução de embriões somáticos de *Manihot esculenta* Crantz, cultivar SC8, bem como o uso da arabinogalactana (AG), uma proteína que promoveu a embriogênese em três genótipos de *Quercus bicolor*, aumentando a frequência de embriogênese somática, e acelerando o início da formação do embrião (MALLÓN et al., 2013), adequação do tempo de exposição dos explantes às auxinas na fase de indução, estimulação da embriogênese secundária (WONGTIEM et al., 2011), adaptação de novos meios e citocininas que estimulem o desenvolvimento dos embriões nas fases de maturação e germinação, com conseqüente aumento na taxa de conversão em plantas.

Entretanto, vale ressaltar que os resultados obtidos com os BGM 116 e BGM 1282 atendem às demandas por um protocolo de regeneração para transformação genética, necessitando de melhorias para aplicação da multiplicação massal de plantas de mandioca.

CONCLUSÕES

Os acessos de mandioca respondem diferentemente à indução da embriogênese somática, mesmo sob condições idênticas de cultivo *in vitro*.

Para que ocorra a formação de calos nos diferentes acessos de mandioca é necessária a adição de alguma auxina ao meio de cultura.

Para o acesso BGM 116 ápices caulinares e folhas jovens podem ser indicados como explantes responsivos à embriogênese somática, desde que contenha 8 e 4 mg L⁻¹ de picloram no meio de cultura, respectivamente, independente da utilização da glutamina.

A conversão de plantas no acesso BGM 116 foi mais eficiente quando se utilizou explantes foliares, independente do tratamento de indução.

O acesso BGM 1282 apresentou melhor resposta quanto ao número de plantas regeneradas.

REFERÊNCIAS

ATEHNKENG, J.; ADETIMIRIN, V. O.; NG, S. Y. C. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 14, p. 1324-1329, 2006.

BHAGYA, N.; CHANDRASHEKAR, K. R.; KARUN, A.; BHAVYASHREE, U. Plantlet regeneration through indirect shoot organogenesis and somatic embryogenesis in *Justicia gendarussa* Burm. f., a medicinal plant. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 474-482, 2013.

BHATTACHARYA, S.; BANDOPADHYAY, T. K.; GHOSH, P. D. Somatic embryogenesis in *Cymbopogon pendulus* and evaluation of clonal fidelity of regenerants using ISSR marker. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 505-513, 2010.

BISPO, N. B.; GRANDO, M.; F.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.890-893, 2007.

BULL, S. E.; OWITI, J. A.; NIKLAUS, M.; BEECHING, J. R.; GRUISSEM, W.; VANDERSCHUREN, H. *Agrobacterium*-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. **Nature Protocols**, v. 4, p. 1845-1854, 2009.

BURNS, A.; GLEADOW, R.; CLIFF, J.; ZACARIAS, A.; CAVAGNARO, T. Cassava: The drought, war and famine crop in a changing world. **Sustainability**, v. 2, p. 3572-3607, 2010.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. de P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia Macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 19-24, 2006.

CARDOSO, C. E. L.; SOUZA, J. da S. Importância, potencialidades e perspectivas do cultivo da mandioca na América Latina. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 29-47. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

CHETTY, C. C.; ROSSIN, C. B.; GRUISSEM, W.; VANDERSCHUREN, H.; REY, M.E.C. Empowering biotechnology in southern Africa: establishment of a robust transformation platform for the production of transgenic industry-preferred cassava. **New Biotechnology**, v. 30, n. 2, p.136-142, 2013.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). **El cultivo de meristemas para saneamiento de clones de yuca**. Guía de estudio. Série 04SC-02.05. Cali, Colombia. 1982. 45p.

FAO, Statistical Database, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Atualizado em 16/01/2013. Acesso em setembro 2013.

FERNANDES, E. H.; PRIOLI, A. J.; SCAPIM, C. A.; SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; MOTERLE, L. M.; Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. p.2604-2607, 2008.

FLETCHER, E. K. A.; AMOAKO, T. N. E.; TWUMASI, P. Effect of 2,4-D, explants type and cultivar on the callogenesis expression of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Ghana. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9396-9401, 2011.

GERDAKANEH, M.; MOZAFARI, A. A.; SIOSEH-MARDAH, A.; SARABI, B.; Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 5, p. 1847-1852, 2011.

GRESSHOFF, P.; DOY, C. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of the anthers for haploid culture of this and other genera. **Z Pflanzenphys**, v. 73, p. 132–141, 1974.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 533-568.

HANKOUA, B. B.; NG, S. Y. C.; FAWOLE, J.; PUONTI-KAERLAS, J.; PILLAY, M.; DIXON, A. G. O. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 221-231, 2005.

HANKOUA, B.B.; TAYLOR, N.J.; NG, S.Y.C.; FAWOLE, I.; PUONTI-KAERLAS, J.; PADMANABHAN, C.; YADAV, J.S.; FAUQUET, C.M.; DIXON, A.G.O.; FONDONG, V.N. Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1700–1712, 2006.

JOSEPH, R.; YEOH, H-H.; LOH, C-S. Induced mutations in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 91-98, 2004.

KERBAUY, G. B.; Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA SPI/EMBRAPA- CNPHS, 1999, v. 2, p. 519-531.

LAKSHMANAN, P.; TAJI, A. Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology**, v. 2, p. 136-148, 2000.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; BARRO, R. S. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia, V. 37, P. 123-130, 2002.

LI, H-Q.; GUO, J. Y.; HUANG, Y. W.; LIANG, C. Y.; LIU, H. X.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998.

LI, R. M.; HU, X. W.; LI, K. M.; FU, S. P.; GUO, J. C. CaCl₂ Enhanced Somatic Embryogenesis in *Manihot esculenta* Crantz. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n.11, p. 2513–2515, 2009.

LI, R. M.; DUAN, R. J.; JI, Y. M.; XI, D. J.; LIU, J.; GUO, J. C.; ZHANG, P.; FU, S. P. Somatic Embryogenesis and Organogenesis of Biofuel Plant Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Chinese Cultivars. **Renewable and Sustainable Energy II**, PTS 1-4 Série de livros: Advanced Materials Research, v. 512-515, p. 558-561, 2012. Disponível em: http://apps.webofknowledge.com/summary.do?SID= 1DvwdQOL827y61ZqZ2q&product=UA&qid=1&search_mode=GeneralSearch. Acesso em: 23/11/2013.

MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C.; SILVA, A. B.; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 107-116, 2003.

MAGALHÃES, J. S.; SANTOS, M. D. M.; CUNHA FILHO, F. N.; BLUMER, L.; GUERRA, M. P.; TORRES, A. C. Indução de embriogênese somática em genótipos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 79-83, 2006.

MALLÓN, R.; Martínez, T.; CORREDOIRA, E.; VIEITEZ, A. M. The positive effect of arabinogalactan on induction of somatic embryogenesis in *Quercus bicolor* followed by embryo maturation and plant regeneration. *Trees-Structure and Function*, v. 27, n. 5, p. 1285–1296, 2013.

MARIASHIBU, T. S.; SUBRAMANYAM, K.; ARUN, M.; THEBORAL, J.; RAJESH, M.; RENGAN, S. K.; CHAKRAVARTHY, R.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Assessment of somatic embryogenesis potency in Indian soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 10, p. 849-859, 2013.

MONJA-MIO, K. M.; ROBERT, M. L. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In vitro Cellular Developmental Biology—Plant*, v. 49, n. 5, p. 541–549, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

OGBURIA, M. N. Somatic embryogenesis, plantlet regeneration and micropropagation of cultivars and F1 hybrids of *Manihot esculenta*. *Biologia Plantarum*, v. 47, n. 3, p. 429-432, 2003.

PELEGRINI, L. L. **Embriogênese somática de *Ocotea porosa* (Ness & Mart.) Barroso (Imbuia)**. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; FRAGA, H. P. F.; HAMASAKI, R. M.; TAVARES, L. B. B.; GUERRA, M. P. Dynamics of free and H-3-labelled glutamine concentrations during zygotic and somatic embryogenesis of Feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret]. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 87, n. 6, p. 583-587, 2012.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, n. 1, p. 13-20, 2010.

RAEMAKERS, K.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. Plant propagation in cassava via somatic embryogenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 14, p. 215-221, 2000.

ROSSIN, C. B.; REY, M. E. C. Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. **South African Journal of Botany**, V. 77, N. 1, P. 59-65, 2011.

SAELIM, L.; PHANSIRI, S.; NETRPHAN, S.; SUKSANGPANOMRUNG, M.; NARANGAJAVANA, J. Optimization of *in vitro* cyclic somatic embryogenesis and regeneration of the asian cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for Genetic Manipulation System. **Global Journal of Biotechnology ; Biochemistry**, v.1, n. 1, p. 07-15, 2006.

SANTANA, M. A.; ROMAY, G.; MATHEUS, J.; VICENTE-VILLARDÓN, J. L.; DEMEY, J. R. A simple and low-cost strategy for micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3789-3897, 2009.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SHAHSAVARI, E. Impacto f tryptophan and glutamine on the tissue culture of upland rice. **Plant Soil Environmental**, v. 57, n. 1, p. 7-10, 2011.

SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q.; RODRIGUES, T. M.; BITTAR, C. A.; LINO, L. O. BAP, 2,4-D e ácido acetilsalicílico na indução e diferenciação de calos em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 5, p. 1205-1212, 2009.

SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L.; FELISMINO, D. C.; CARVALHO, J. M. F. C. Indução de calos embriogênicos nas cultivares BRS Araripe e BRS Seridó do algodoeiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 9, n. 2, p., 2009.

STAMP, J. A.; HENSHAW, G. G. Somatic embryogenesis in cassava. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 105, p. 183-187, 1982.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A.; CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botânica Brazilian**, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

WONGTIEM, P.; COURTOIS, D.; FLORIN, B.; JUCHAUX, M.; PELTIER, D.; BROUN, P.; DUCOS, J. P. Effects of cytokinins on secondary somatic embryogenesis of selected clone Rayong 9 of *Manihot esculenta* Crantz for ethanol production. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 9, p. 1600-1608, 2011.

ZHANG, P.; LEGRIS, G.; COULIN, P.; PUONTI-KAERLAS, J. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 939-945, 2000.

CAPÍTULO 2

FIDELIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) UTILIZANDO MARCADORES ISSR¹

¹ Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Euphytica.

**FIDELIDADE E VARIABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS
MICROPROPAGADAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) UTILIZANDO
MARCADORES ISSR**

RESUMO: O uso de marcadores moleculares para avaliar a fidelidade genética de plantas após o cultivo *in vitro* tem sido eficiente em diversas espécies. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a fidelidade e a variabilidade genética de plantas micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) por meio de marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*). Foram utilizados 22 acessos de *Manihot esculenta* Crantz, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. De cada acesso foi extraído o DNA da planta mantida no campo, e de três plantas cultivadas *in vitro* em meio de multiplicação 17N. Para a amplificação do DNA, foram utilizados 27 *primers* ISSR, sendo 24 selecionados para realização das análises moleculares. A partir da matriz de distância genética obtida pelo índice do complemento de Jaccard, foi realizado o agrupamento dos genótipos utilizando-se o método UPGMA (*Unweighed Pair Group Method using Arithmetic Averages*). O resultado das amplificações geraram 175 bandas, das quais 100 foram polimórficas e usadas no estudo de variabilidade genética entre os acessos de mandioca no campo. O número de bandas por *primer* variou de 2 a 13 com uma média de 7,3 bandas por *primer*. Para o estudo de fidelidade genética, para a maioria dos acessos micropropagados, não ocorreu variação genética entre plantas do mesmo acesso mantidas em campo e *in vitro*, confirmando a alta fidelidade genética das plantas micropropagadas. Entretanto, foi observada variabilidade genética entre os diferentes acessos do campo avaliados, e o agrupamento com base na matriz de dissimilaridade revelou a formação de sete grupos distintos. A maior dissimilaridade genética observada foi entre os acessos BGM 668 e BGM 1840 (0,32), enquanto que a menor foi entre BGM 1037 e BGM 1324 (0,07). Os marcadores ISSR foram eficientes na detecção da homogeneidade genética de plantas de mandioca oriundas da cultura de meristemas, demonstrando confiabilidade nesse sistema de propagação.

Palavras-chave: Germoplasma, Cultivo de meristema, Marcador molecular, Variação somaclonal.

GENETIC FIDELITY AND VARIABILITY OF MICROPROPAGATED PLANTS OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz) USING ISSR MARKERS

ABSTRACT: The use of molecular markers to assess the genetic fidelity of plants after *in vitro* culture has shown to be effective for several species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the genetic fidelity and variability of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) micropropagated plants using ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) markers. A total of 22 accessions of *Manihot esculenta* Crantz, from the Cassava Germplasm Bank at Embrapa Cassava and Fruits, were evaluated. DNA was extracted from young leaves of cassava plants in the field, and three plants grown *in vitro* in multiplication medium 17N. Twenty-seven ISSR *primers* were used in the amplification and 24 selected for the molecular analysis. The distance matrix was obtained by the Jaccard index and the clusters by the UPGMA (Unweighed Pair Group Method using Arithmetic Averages) method. 175 bands were generated, with 100 polymorphic used in this study. The number of bands per *primer* ranged from 2 to 13 with an average of 7.3 bands/*primer*. There was no genetic variation for most of the of the plants from the same accessions maintained in the field and *in vitro*, confirming the genetic fidelity of the micropropagated plants. Genetic variability, however, was observed among the accessions evaluated in the field, and cluster based on the dissimilarity matrix formed seven groups. The highest genetic dissimilarity was for accessions BGM 668 and BGM 1840 (0.32), while the lowest was between BGM 1037 and BGM 1324 (0,07). ISSR markers were effective in detecting genetic homogeneity of the cassava plants derived from meristem culture, demonstrating reliability of this propagation system.

Keywords: Germplasm, Meristem culture, Molecular marker, Somaclonal variation.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é considerada uma importante fonte de alimentos para milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, é encontrada em todo o território nacional, desde o Estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul (FUKUDA et al., 2003). Considerada uma das culturas alimentares mais importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, ocupa posição de destaque entre as principais fontes de energia alimentar em termos de consumo calórico global, classificada abaixo do trigo, arroz, milho e sorgo (ADEYEMO, 2009).

A mandioca é tolerante à seca e possui ampla adaptação às mais variadas condições de clima e solo. A parte mais importante da planta são as raízes tuberosas, ricas em amido, e utilizadas na alimentação humana e animal. Adicionalmente, apresenta grande importância na indústria com a produção de fécula, bem como fabricação de cosméticos, produtos farmacêuticos, etc. (FUKUDA et al., 2002, MORO, 2009).

A propagação da mandioca é feita vegetativamente por meio de estacas, o que ocasiona baixa produção provocada pela constante multiplicação, além da infestação por doenças que são transmitidas por sucessivas gerações (SILVA et al., 2002).

Devido à lenta e baixa taxa de propagação da mandioca, é de grande importância o desenvolvimento de técnicas alternativas de multiplicação acelerada e que permitam a disponibilização rápida de material de plantio isento de pragas e patógenos. Dentre tais alternativas, pode-se destacar a micropropagação (SOUZA et al., 2009), técnica que permite a produção clonal de plantas de qualidade em curto período de tempo e espaço físico reduzido, além de garantir a qualidade fitossanitária (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em mandioca, o estabelecimento dos cultivos *in vitro* para dar início ao processo de micropropagação, se dá pelo cultivo de meristemas, permitindo a produção de mudas sadias para a formação de matrizeiros, que possam sustentar novos plantios com material propagativo de qualidade. Entretanto, a fidelidade clonal é um dos pré-requisitos mais importantes na micropropagação de quaisquer espécies de cultivo (RIBEIRO, 2012).

Um grande problema encontrado frequentemente com o cultivo *in vitro* é a presença de variação somaclonal entre subclones de uma linha parental, que surge

como uma consequência direta da cultura *in vitro* de células vegetais, tecidos ou órgãos (VENKATACHALAM et al., 2007).

Segundo Alves et al. (2004), o conhecimento dos mecanismos que causam a variação somaclonal, assim como os procedimentos adequados para evitar sua ocorrência, e o desenvolvimento de métodos de detecção precoce, são fatores importantes para a produção de mudas micropropagadas com qualidade e segurança.

Uma estratégia para detectar variantes somaclonais é a utilização de marcadores moleculares, uma vez que acessam o genoma, não são afetados pelo ambiente evitando erros de identificação (BORBA et al., 2005).

Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) têm sido aplicados com sucesso para detectar as diferenças ou semelhanças genéticas em diversas plantas micropropagadas, tais como gérbera (BHATIA et al., 2009), antúrio (GANTAIT; SINNIAN, 2011) e uva (NOOKARAJU; AGRAWAL, 2012). A alta reprodutibilidade, simplicidade e baixo custo do procedimento experimental com ISSR, devem ser considerados quando é necessário se processar um grande número de amostras (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001).

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética entre acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) mantidos a campo e a fidelidade genética dentro de diferentes acessos de plantas micropropagadas, utilizando marcadores ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e extração de DNA

Como material vegetal foram utilizadas folhas jovens de 22 acessos de mandioca provenientes do Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação, nome vulgar, procedência e aptidão de 22 acessos de mandioca mantidos a campo, utilizados para avaliar a diversidade e fidelidade genética *in vitro*, por meio de marcadores ISSR.

Número	Acessos	Nome vulgar	Procedência	Aptidão
1	BGM 212	Eucalipto	Boa Vista do Tupim-BA	Consumo humano
2	BGM 264	Cigana	Amargosa-BA	Farinha
3	BGM 561	Cambará	Itambé-PE	Farinha
4	BGM 563	Pi90	Muritiba-BA	Farinha
5	BGM 337*	CM375/1	Cali-Colômbia	-
6	BGM 316*	CM367/2	Cali-Colômbia	-
7	BGM 340*	CM305/5	Cali-Colômbia	-
8	BGM 640	Sacaí I	Paraípaba-CE	Farinha
9	BGM 1723	Jussara CNPMF	Cruz das Almas-BA	Farinha
10	BGM 1840	São Pedro	Belém-PA	Farinha
11	BGM 638	Guarani	Pentecoste-CE	Farinha
12	BGM 1123	Aipim valenca	Piritiba-BA	Consumo humano
13	BGM 668	Nacionalista	Viçosa-MG	Ornamental
14	BGM 1037	Casco de burro	Aurora do Norte-TO	Consumo humano
15	BGM 1811**	Formosa	Cruz das Almas-BA	Farinha/fécula
16	BGM 1245	MNag-1	Nigéria-África	-
17	BGM 1324	Mandioca folha virada	Afogados da Engazeira-PE	Farinha
18	BGM 1345	Macaxeira preta	Congo-PB	Consumo humano
19	BGM 1348	Caideira	Sumé-PB	Farinha
20	BGM 1371	Mandioca alagoa	Soledade-PB	Farinha
21	BGM 116	Cigana preta	Castro Alves-BA	Farinha/fécula
22	BGM 1282	Macaxeira-cará	Ouricuri-PE	Consumo humano

Fonte: www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/bag_man.xls.

*Aptidão não informada; ** Resistente à bacteriose.

De cada acesso foram utilizadas quatro plantas, sendo uma planta mantida em campo (c) e três plantas cultivadas *in vitro* (1i, 2i, 3i) no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura após sete subcultivos.

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, utilizando-se o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. As amostras de DNA foram quantificadas em gel

de agarose 0,8% e visualizadas sob luz ultravioleta. O DNA foi diluído a 5 ng/μl para utilização nas reações de amplificação.

Amplificação

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (modelo Applied Biosystems Veriti, 96 well Thermal Cycler) utilizando-se 27 *primers* ISSR (Tabela 2). O volume final das reações foi de 15 μl contendo 0,2 mM de dNTP, tampão 1x, 2,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase, 0,4 mM de *primer* e 10 ng de DNA genômico.

Tabela 2. Relação de *primers* ISSR utilizados e sequência (5' - 3').

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')
ISSR 12	GAGAGAGAGAGAGAGARC
ISSR 24	AGTGTGTGTGTGTGTGT
ISSR 25	CGTGTGTGTGTGTGTGT
ISSR 31	CRCACCACCACCACCAC
ISSR 32*	CYCACCACCACCACCAC
ISSR 33	CAGCAGCAGCAGCAG
ISSR 34	CAGCAGCAGCAGCAGRC
ISSR 35*	CAGCAGCAGCAGCAGYC
ISSR 36	CRCAGCAGCAGCAGCAG
ISSR 37	CYCAGCAGCAGCAGCAG
ISSR 39	GTGGTGGTGGTGGTGRC
ISSR 40	GTGGTGGTGGTGGTGYC
ISSR 41	CRGTGGTGGTGGTGGTG
ISSR 42	CYGTGGTGGTGGTGGTG
ISSR 47	CYTGTTGTTGTTGTTGT
ISSR 58	ACGACGACGACGACGRC
ISSR 59	AGAAGAAGAAGAAGARC
ISSR 69	TTGTTGTTGTTGTTGRC
ISSR 83	CTGCTGCTGCTGCTGRC
ISSR 86	CGACGACGACGACGARC
ISSR 90	GAAGAAGAAGAAGAARC
ISSR 91	GATGATGATGATGATRC
ISSR 92	GACGACGACGACGACRC
ISSR 93	GAGGAGGAGGAGGAGRC
ISSR 94	GTAGTAGTAGTAGTARC
ISSR 97*	GCAGCAGCAGCAGCARC
ISSR 101	GGAGGAGGAGGAGGARC

**Primers* não utilizados nas análises moleculares por serem monomórficos.

O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido por 39 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de extensão final por 10 minutos a 72 °C e 14 °C ∞. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em agarose 2,5% em 0,5X tampão TBE. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

Análise dos dados

Os fragmentos de DNA amplificados foram computados como presença ou ausência de bandas, e montada uma matriz com 1 representando presença e 0 representando ausência de banda no gel. As distâncias genéticas entre os acessos foram avaliadas por meio de matriz de dissimilaridade gerada pelo índice do complemento de Jaccard e o agrupamento dos genótipos gerados pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*) utilizando-se o software GENES (CRUZ et al., 2003). O dendrograma foi construído por meio do software STATISTICA (STATISTICA, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo de diversidade genética entre acessos de mandioca mantidas a campo

Dos 27 *primers* ISSR testados, apenas 24 apresentaram polimorfismo. Estes 24 *primers* geraram um total de 175 bandas, onde 100 destas foram polimórficas (57,1%). O número de bandas para cada *primer* variou de dois a 13 com uma média de 7,3 bandas por *primer* (Tabela 3).

O número mínimo de bandas polimórficas foi obtido para os *primers* ISSR 37, 59, 86 e 92 (uma banda). Quanto ao número máximo de bandas polimórficas, obtido para o *primer* ISSR 12 com 11 bandas, gerando 84,6% de polimorfismo (Tabela 3).

Tabela 3. Relação de *primers* ISSR, número de produtos amplificados, número de bandas monomórficas e polimórficas e porcentagem de polimorfismo em 22 acessos de mandioca.

<i>Primer</i>	Bandas			% polimorfismo
	Total	Monomórficas	Polimórficas	
ISSR 12	13	2	11	84,6
ISSR 24	9	4	5	55,6
ISSR 25	6	2	4	66,7
ISSR 31	7	5	2	28,6
ISSR 33	11	8	3	27,3
ISSR 34	10	3	7	70,0
ISSR 36	10	6	4	40,0
ISSR 37	4	3	1	25,0
ISSR 39	11	6	5	45,5
ISSR 40	8	1	7	87,5
ISSR 41	10	1	9	90,0
ISSR 42	9	4	5	55,6
ISSR 47	9	4	5	55,6
ISSR 58	7	5	2	28,6
ISSR 59	2	1	1	50,0
ISSR 69	7	3	4	57,1
ISSR 83	7	5	2	28,6
ISSR 86	3	2	1	33,3
ISSR 90	9	1	8	88,9
ISSR 91	6	1	5	83,3
ISSR 92	2	1	1	50,0
ISSR 93	9	6	3	33,3
ISSR 94	3	0	3	100,0
ISSR 101	3	1	2	66,7
Total	175	75	100	57,1
Média	7,3	3,1	4,2	56,3

O perfil eletroforético de 22 acessos do campo utilizando-se o *primer* ISSR-90 encontra-se na Figura 1.

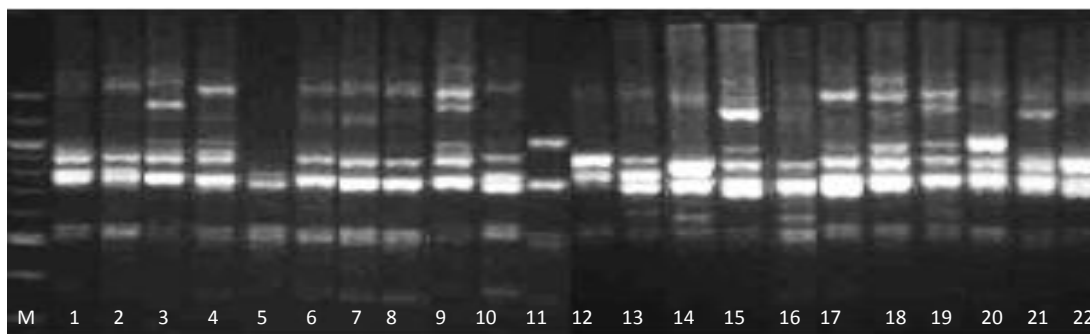


Figura 1. Perfil eletroforético do *primer* ISSR-90 em gel de agarose 2,5% em 22 acessos de mandioca (1- BGM 212; 2- BGM 264; 3- BGM 561; 4- BGM 563; 5- BGM 337; 6- BGM 316; 7- BGM 340; 8- BGM 640; 9- BGM 1723; 10- BGM 1840; 11- BGM 638; 12- BGM 1123; 13- BGM 668; 14- BGM 1037; 15- 1811; 16- BGM 1245; 17- BGM 1324; 18- BGM 1345; 19- BGM 1348; 20- BGM 1371; 21- BGM 116; 22- BGM 1282) mantidos a campo pertencentes ao BAG-Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

No presente estudo, a maior dissimilaridade genética entre os acessos de mandioca foi entre os BGM 668 e 1840 (0,32), enquanto que os acessos menos dissimilares geneticamente foram BGM 1037 e 1324 (0,07) (Tabela 4). Esse comportamento reflete inclusive, as diferentes procedências desses materiais.

Silva et al. (2011) ao avaliarem a diversidade genética intra- e inter-específica de acessos de *Manihot* por meio de ISSR, obtiveram maior dissimilaridade (0,69) entre *M. esculenta* var. *mandiocaba* e *M. dichotoma* e menor dissimilaridade (0,49) entre *M. dichotoma* var. *undulata* e *M. caerulescens*. Neste caso, os autores observaram maior dissimilaridade entre indivíduos da mesma espécie do que entre espécies do mesmo gênero.

Zayed et al. (2013) utilizaram marcadores ISSR para medir a distância genética entre quatro genótipos de mandioca importados da Indonésia, Brasil e Tailândia (2 genótipos), encontrando maior dissimilaridade (0,25) entre o genótipo do Brasil e o da Indonésia, enquanto a menor dissimilaridade foi obtida entre um dos genótipos da Tailândia e Brasil.

A partir dessas observações e dos resultados obtidos no presente estudo, fica claro a eficiência dos marcadores ISSR em revelar diversidade genética em mandioca, tanto entre os genótipos de uma mesma espécie, bem como as espécies do mesmo gênero.

Tabela 4. Matriz de dissimilaridade genética estimada pelo coeficiente de Jaccard para os 22 acessos de mandioca.

	BGM 212	BGM 264	BGM 561	BGM 563	BGM 337	BGM 316	BGM 340	BGM 640	BGM 1723	BGM 1840	BGM 638	BGM 1123	BGM 668	BGM 1037	BGM 1811	BGM 1245	BGM 1324	BGM 1345	BGM 1348	BGM 1371	BGM 116	BGM 1282	
BGM 212	0,00																						
BGM 264	0,15	0,00																					
BGM 561	0,17	0,17	0,00																				
BGM 563	0,17	0,20	0,10	0,00																			
BGM 337	0,16	0,17	0,17	0,18	0,00																		
BGM 316	0,17	0,16	0,18	0,20	0,14	0,00																	
BGM 340	0,17	0,13	0,16	0,17	0,14	0,17	0,00																
BGM 640	0,19	0,14	0,17	0,18	0,12	0,15	0,12	0,00															
BGM 1723	0,19	0,18	0,17	0,16	0,17	0,19	0,18	0,12	0,00														
BGM 1840	0,23	0,20	0,23	0,24	0,22	0,24	0,23	0,21	0,22	0,00													
BGM 638	0,20	0,22	0,22	0,22	0,19	0,21	0,19	0,14	0,19	0,28	0,00												
BGM 1123	0,20	0,21	0,25	0,24	0,21	0,23	0,18	0,21	0,23	0,28	0,16	0,00											
BGM 668	0,24	0,21	0,23	0,28	0,27	0,23	0,24	0,23	0,26	0,32	0,25	0,23	0,00										
BGM 1037	0,17	0,18	0,21	0,17	0,19	0,18	0,18	0,19	0,19	0,26	0,14	0,12	0,18	0,00									
BGM 1811	0,23	0,22	0,24	0,25	0,19	0,18	0,19	0,21	0,20	0,29	0,19	0,19	0,20	0,12	0,00								
BGM 1245	0,23	0,22	0,23	0,23	0,23	0,26	0,18	0,19	0,22	0,28	0,21	0,18	0,22	0,10	0,22	0,00							
BGM 1324	0,22	0,20	0,23	0,23	0,22	0,20	0,20	0,23	0,22	0,21	0,20	0,17	0,25	0,07	0,17	0,15	0,00						
BGM 1345	0,23	0,23	0,23	0,26	0,24	0,25	0,18	0,23	0,23	0,28	0,21	0,20	0,23	0,12	0,21	0,13	0,08	0,00					
BGM 1348	0,26	0,22	0,23	0,24	0,22	0,22	0,19	0,19	0,23	0,25	0,23	0,15	0,24	0,14	0,19	0,16	0,18	0,15	0,00				
BGM 1371	0,23	0,15	0,17	0,19	0,21	0,21	0,17	0,17	0,19	0,26	0,21	0,21	0,22	0,16	0,23	0,18	0,17	0,16	0,16	0,00			
BGM 116	0,23	0,16	0,19	0,22	0,19	0,18	0,14	0,20	0,20	0,28	0,23	0,18	0,23	0,13	0,18	0,20	0,19	0,17	0,15	0,12	0,00		
BGM 1282	0,16	0,17	0,17	0,20	0,20	0,18	0,15	0,22	0,21	0,26	0,21	0,23	0,24	0,17	0,20	0,21	0,20	0,19	0,18	0,17	0,18	0,00	

O dendrograma foi construído a partir de 100 bandas polimórficas e o índice do complemento de Jaccard utilizado para a obtenção da matriz de dissimilaridade genética (Figura 2). Os 22 acessos de mandioca foram separados em sete grupos de acordo com o método de agrupamento UPGMA e ponto de corte escolhido de acordo com o critério de Mingote (2005).

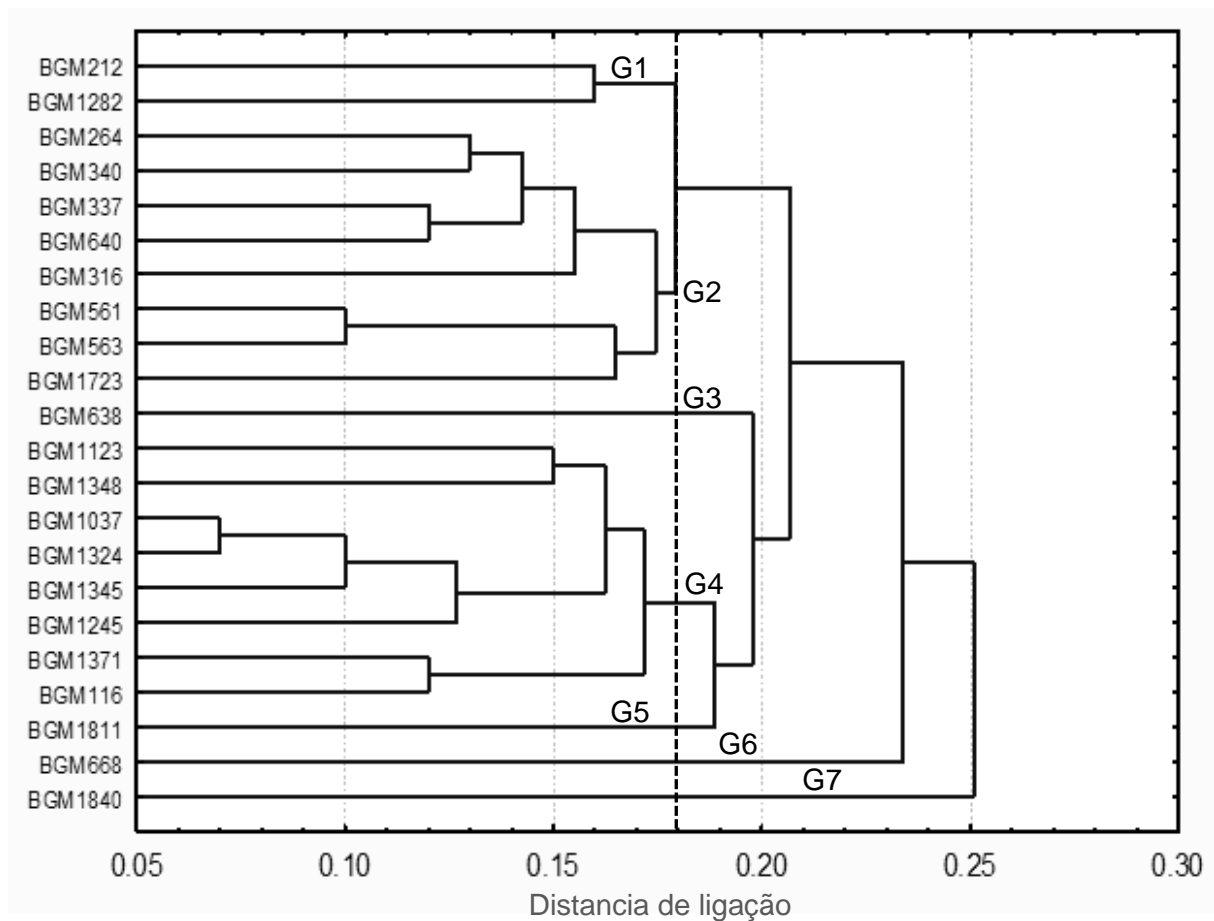


Figura 2. Dendrograma gerado pelo método UPGMA utilizando 100 bandas polimórficas a partir de 24 marcadores ISSR, mostrando as relações genéticas entre os 22 acessos de mandioca pertencentes ao BAG-Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

O primeiro grupo, G1, foi formado por dois acessos: BGM 212, BGM 1282. O segundo grupo, G2, pelos acessos: BGM 264, BGM 340, BGM 337, BGM 640, BGM 316, BGM 561, BGM 563 e BGM 1723. O terceiro grupo, G3, foi formado apenas pelo BGM 638. O quarto grupo (G4), formado pelos acessos: BGM 1123, BGM 1348, BGM 1037, BGM 1324, BGM 1345, BGM 1245, BGM 1371 e BGM 116. O quinto

(G5), sexto (G6) e sétimo grupos (G7), formados pelos acessos, BGM 1811, BGM 668 e BGM 1840, respectivamente.

Dentre os grupos formados, apenas o segundo (G2) foi agrupado por acessos com semelhança na aptidão. Mesmo provindos de diferentes regiões do Brasil, esses acessos apresentam aptidão para produção de farinha. Os demais grupos (G1, G3, G4, G5 e G7) são constituídos de acessos com aptidões para consumo humano e/ou farinha, exceto pelo acesso do sexto grupo (G6) que não apresentou nenhuma relação na aptidão com outros acessos.

Esse estudo preliminar da diversidade genética entre os acessos mantidos a campo, demonstra que existe variabilidade que poderá ser utilizada dentro do programa de melhoramento genético da espécie.

Fidelidade genética entre acessos do campo e cultivados *in vitro*

Para a maioria dos perfis eletroforéticos testados em nosso estudo com 24 marcadores ISSR, a fidelidade entre os acessos do campo e os multiplicados *in vitro* durante sete subcultivos, foi avaliada. A Figura 3 apresenta o perfil eletroforético entre plantas mantidas a campo (c) e suas respectivas plantas provenientes de sete subcultivos *in vitro* (i) utilizando-se o *primer* ISSR 39.

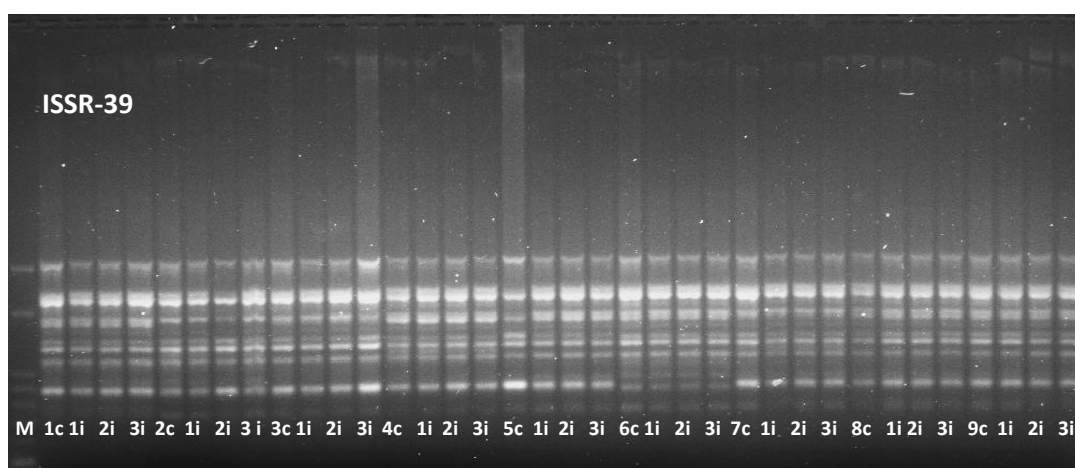


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5% do *primer* ISSR-39 em plantas mantidas a campo (c) e seus respectivos clones derivados de meristemas (1i, 2i, 3i) de nove acessos de mandioca (1 a 9). 1- BGM 212; 2- BGM 264; 3- BGM 561; 4- BGM 563; 5- BGM 337; 6- BGM 316; 7- BGM 340; 8- BGM 640; 9- BGM 1723. M= Marcador ladder 1 kb (Invitrogen™).

Diversos autores tem utilizado a cultura de tecidos para regenerar plantas de mandioca, seja por organogênese com a cultura de meristemas (OLIVEIRA et al., 2000), explantes nodais e gemas axilares (KONAN et al., 1997; LIMA et al., 2002), ou embriogênese somática (HANKOUA et al., 2005; SAELIM et al., 2006). Entretanto, não há registros de estudos de variação somaclonal nas plantas de mandioca regeneradas por um dos sistemas citados acima, exceto por Raemakers et al. (2001), que observaram variações na forma, coloração e tamanho de folhas, bem como presença de ramificações, tamanho e vigor reduzidos em plantas transgênicas regeneradas a partir da cultura de calos embriogênicos friáveis (CEF) em seis dos 10 genótipos de mandioca testados. Como mencionado, essas observações foram feitas em nível morfológico, não tendo outros registros com o uso de marcadores moleculares. Estes, por sua vez, são amplamente utilizados na cultura da mandioca em estudos de similaridade, divergência, variabilidade genética e caracterização molecular (COSTA et al., 2003; VIEIRA et al., 2008; VIEIRA et al., 2010).

Assim como neste trabalho, diversos autores têm utilizado os marcadores ISSR para verificar a fidelidade genética de plantas micropropagadas. Pathak e Dhawan (2012) confirmaram a estabilidade clonal de plantas do porta-enxerto de macieira Merton 793 regeneradas a partir de gemas axilares, com 22 subcultivos, por meio de 15 *primers* ISSR. Esses autores observaram um perfil homogêneo de amplificação para todas as plantas micropropagadas em comparação com a planta doadora.

Da mesma forma, Lu et al. (2011) utilizaram 45 *primers* ISSR para avaliar a identidade genética e monitorar a variação somaclonal de 30 cultivares de bananeira durante a micropropagação, usando meristemas como fonte de explantes. Os autores também observaram um perfil de amplificação homogêneo em todas as plantas micropropagadas em comparação com suas plantas-mãe.

O presente estudo está em conformidade com os relatos anteriores acerca da aplicabilidade dos marcadores ISSR em estudo de fidelidade de plantas derivadas de meristemas. Contudo, algumas observações interessantes podem ser feitas a respeito da possibilidade de ocorrência de variação somaclonal, quando utilizou-se os *primers* ISSR-37 (Figura 4) e ISSR-25 (Figura 5), que apresentam exemplos de diferenças genéticas entre os acessos multiplicados *in vitro* e seus respectivos acessos mantidos a campo.

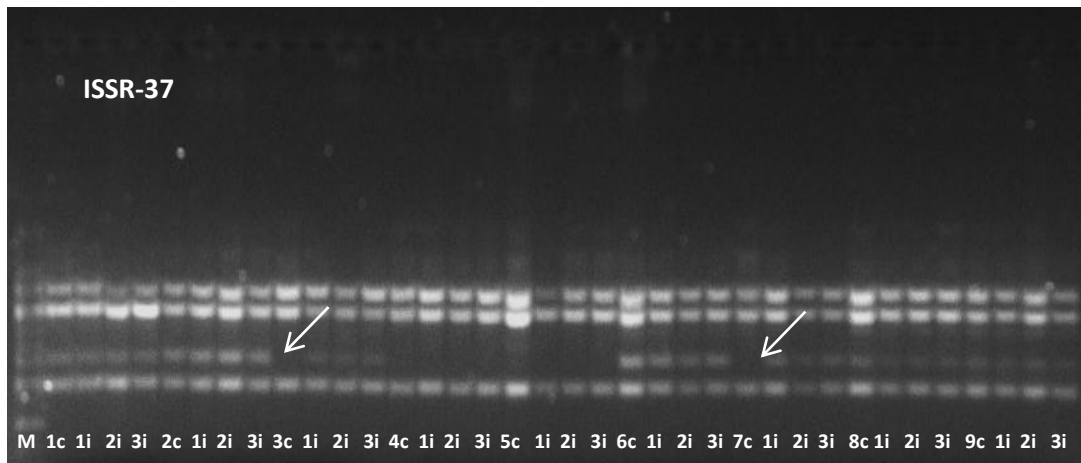


Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5% do *primer* ISSR-37 em plantas do campo (c) e seus respectivos clones derivados de meristemas (1i, 2i, 3i) de nove acessos de mandioca. 1- BGM 212; 2- BGM 264; 3- BGM 561; 4- BGM 563; 5- BGM 337; 6- BGM 316; 7- BGM 340; 8- BGM 640; 9- BGM 1723. M= Marcador ladder 1 kb (Invitrogen™). As setas brancas representam acessos do campo com divergências genéticas em relação ao seu material multiplicado *in vitro*.

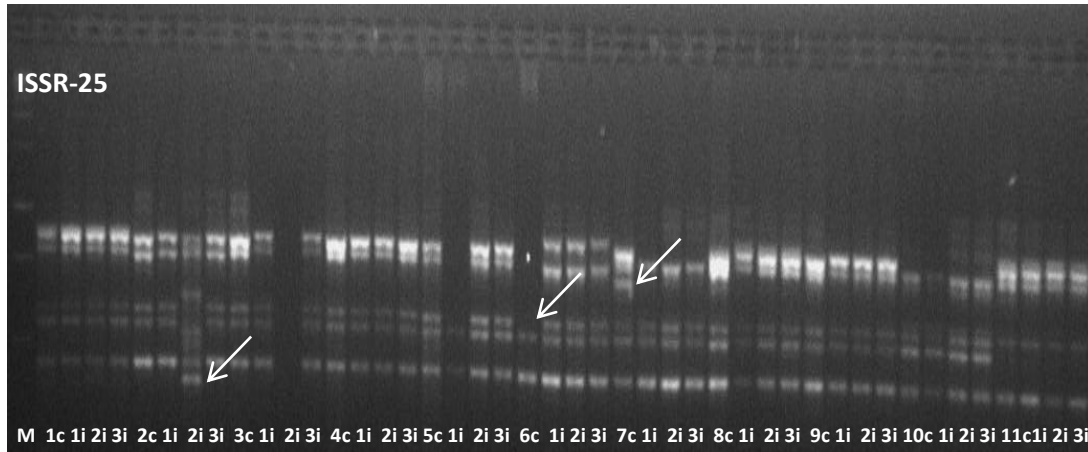


Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5% do *primer* ISSR-25 em plantas do campo (c) e seus respectivos clones derivados de meristemas (1i, 2i, 3i) de 11 acessos de mandioca. 1- BGM 212; 2- BGM 264; 3- BGM 561; 4- BGM 563; 5- BGM 337; 6- BGM 316; 7- BGM 340; 8- BGM 640; 9- BGM 1723, 10- BGM 1840, 11- BGM 638. M= Marcador ladder 1 kb (Invitrogen™). As setas brancas representam divergências genéticas entre os materiais.

Na Figura 4, com o uso do *primer* ISSR-37, houve diferença entre os acessos mantidos a campo, como por exemplo, para os acessos BGM 561 e BGM 340, onde

os acessos *in vitro* possuem a banda, mas seus respectivos a campo, não. Para o acesso BGM 561, essa diferença apareceu apenas com o uso do *primer* ISSR-37. Já para o acesso BGM 340, essa diferença genética entre o acesso a campo e seu respectivo correspondente *in vitro*, ficou evidente para os *primers* ISSR-37, 25, 90, 47 e 36. Esse tipo de resultado indica haver algum problema ou de coleta, ou possível ocorrência de variação somaclonal, que poderá em futuro próximo, ser explorada no programa de melhoramento da cultura.

O *primer* que gerou o maior número de diferenças genéticas entre o material de campo e os acessos multiplicados *in vitro*, foi o ISSR-25. Como pode ser observado na Figura 5, esse *primer* demonstrou diferenças genéticas entre acessos do campo e seus respectivos representantes subcultivados, para os acessos BGM 316 e BGM 340, com o acesso BGM 316 faltando uma banda no acesso no campo em relação aos acessos subcultivados *in vitro* e o acesso BGM 340 faltando uma banda em relação aos seus respectivos materiais *in vitro*.

Entretanto, para o acesso BGM 316, esse fato apenas ocorreu com esse único *primer*, não havendo repetições suficientes para comprovação da ocorrência ou não de variação somaclonal ou qualquer outro tipo de ocorrência como de erro de coleta. Por outro lado, para o acesso BGM 340, é interessante dar prosseguimento para verificar se realmente está havendo variação somaclonal, ou se houve problemas na coleta.

O fato do banco de germoplasma de mandioca mantido a campo estar sempre mudando de área, também pode levar a problemas de identificação e troca de acessos, que acaba refletindo em análises genéticas em nível de DNA.

Com base nos resultados do presente trabalho, fica claro que a metodologia de micropropagação/subcultivo adotada pelo Laboratório de Cultura de Tecido de Plantas da Embrapa Mandioca e Fruticultura manteve a fidelidade dos acessos a campo e multiplicados *in vitro*.

Vale a pena ressaltar que para uma melhor identificação da ocorrência de variação somaclonal, é necessário haver um maior número de repetições *in vitro* do material em multiplicação, bem como haver a necessidade de uso de outras técnicas como citogenética, citometria de fluxo, sequenciamento, clonagem e alinhamento de sequências de fragmentos, além de testes a campo para verificar o comportamento de possível ocorrência de variação somaclonal.

CONCLUSÕES

1. O estudo molecular de plantas cultivadas *in vitro* revelou uniformidade genética entre a maioria das plantas *in vitro* e suas respectivas plantas a campo para os acessos avaliados.
2. Os marcadores ISSR foram eficientes na determinação da homogeneidade genética de plantas de mandioca oriundas da cultura de meristemas, demonstrando confiabilidade nesse sistema de propagação.
3. Pode estar havendo variação somaclonal para o acesso BGM 340, mas há necessidade de estudos mais aprofundados para esta afirmação.

REFERÊNCIAS

- ADEYEMO, S. **Molecular genetic characterization of photoperiodic genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and attempts to manipulate their expression to promote floral induction**. 2009. 133f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Universität zu Köln, Köln.
- ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. TRINDADE, A. V. Propagação. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Eds.) **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 59-86.
- BHATIA, A.; SINGH, K. P.; JHANG, T.; SHARMA, T. R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers, **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 208–211, 2009.
- BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 565-569, 2005.
- COSTA, M. R.; CARDOSO, H. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 158-164, 2003.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes**, Versão Windows (2003.0.0). UFV, Viçosa, Brasil. 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. IGLESIAS, C. Breeding cassava. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 617-638, 2002.

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

GANTAIT, S.; SINNIH, U. R. Morphology, flow cytometry and molecular assessment of ex-vitro grown micropropagated anthurium in comparison with seed germinated plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 64, p. 13991-13998, 2011.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, n. 1, p. 81-89, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

HANKOUA, B. B.; NG, S.Y.C.; FAWOLE, I.; PUONTI-KAERLAS, J.; PILLAY, M.; Dixon, A. G. O. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 221-231, 2005.

KONAN, N. K.; SCHIIPKE, C.; CÁRCAMO, R.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 444-449, 1997.

LIMA, G. P. P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I. M. T.; CEREDA, M. P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ cv Mcol 22) cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 8, n. 2, p. 107-110, 2002.

LU, Y.; ZHANG, X.; PU, J.; QI, Y.; XIE, Y. Molecular assessment of genetic identity and genetic stability in banana cultivars (*Musa* spp.) from China using ISSR markers. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 1, p. 25-31, 2011.

MINGOTE, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: ed. UFMG. 297p. 2005.

MORO, A. L. **Obtenção de massa de mandioca com adição de maltodextrina de amido de milho waxy**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônômicas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu.

NOOKARAJU, A.; AGRAWAL, D. C. Genetic homogeneity of *in vitro* raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. **South African Journal of Botany**, v. 78, p. 302-306, 2012.

OLIVEIRA, R. P.de; GOMES, T. da S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000.

PATHAK, H.; DHAWAN, V. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. ***In vitro Cellular Developmental Biology - Plant***, v. 48, p. 137–143, 2012.

RAEMAKERS, K.; SCHREUDER, M.; PEREIRA, I.; MUNYIKWA, T.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. Progress made in FEC transformation of cassava. ***Euphytica***, v. 120, p. 15–24, 2001.

RIBEIRO, A. P. **Micropropagação, avaliação da variação somaclonal e detecção de vírus em videira**. Dissertação de mestrado em Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras. 128 f. 2012.

SAELIM, L.; PHANSIRI, S.; NETRPHAN, S.; SUKSANGPANOMRUNG, M.; Narangajavana, J. Optimization of *in vitro* cyclic somatic embryogenesis and regeneration of the Asian cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for genetic manipulation system. ***Global Journal of Biotechnology; Biochemistry***, v. 1, n. 1, p. 07-15, 2006.

SILVA, M. N. da; CEREDA, M. P.; FIORINI, R. A. Multiplicação rápida de mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 187-197. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 2).

SILVA, K. V. P. da; ALVES, A. A. da C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F. de; CARVALHO, R. de. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, v.46, n.9, p.1082-1088, 2011.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SILVA NETO, H. P. da S.; MENEZES, M. C.; SILVEIRA, D. G.; SANTOS, V. da S. Micropropagação da mandioca. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Eds). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 323-349.

STATISTICA, **STATISTICA for Windows v. 6.0: Computer Program Manual**. Editora StatSoft Inc. Tulsa, UK (CD-Rom), 2002.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. ***In vitro Cellular Developmental Biology - Plant***, v. 43, n. 3, p. 267-274, 2007.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. de F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. CARVALHO, L. J. C. B.; G. da; SILVA, M. S.; PAULA-MORAES, S. V. de; SANTOS FILHO, M. O. S. dos; SILVA, K. N. da. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, v.43, n.12, p.1707-1715, 2008.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. de F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G. da; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, M. S. Caracterização molecular e variabilidade genética de acessos elite de mandioca para fins industriais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2467-2471, 2010.

ZAYED, E. M.; SHAMS, A. S. KAMEL, A. S. Genetic diversity in introduced cassava using Inter Simple Sequence Repeat markers (ISSRs). **Geneconserve**, v. 12, n. 47, p. 23-33, 2013.

CAPÍTULO 3

ESTABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE MANDIOCA REGENERADAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA UTILIZANDO MARCADORES ISSR E IRAP¹

¹ Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Genetics and Molecular Research.

ESTABILIDADE GENÉTICA DE PLANTAS DE MANDIOCA REGENERADAS POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA UTILIZANDO MARCADORES ISSR E IRAP

RESUMO: Em micropropagação, a variabilidade genética se torna indesejável, uma vez que a fidelidade clonal é um dos pré-requisitos mais importantes para se iniciar o cultivo *in vitro* de espécies com interesse comercial. Desta forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar por meio dos marcadores moleculares *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR) e *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism* (IRAP) a homogeneidade genética de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) derivadas de embriões somáticos após dois subcultivos. Como material vegetal foram utilizados dois acessos de mandioca (BGM 116 e BGM 1282), obtidos do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. As plantas regeneradas por embriogênese somática foram comparadas com a planta-mãe, mantida no campo, e por uma planta derivada do cultivo de meristemas mantida *in vitro* em meio 17N. De cada acesso foi realizado a extração de DNA das plantas provenientes das três condições de cultivo. Na amplificação foram selecionados 14 *primers* ISSR e quatro marcadores IRAP, os quais produziram um total de 90 bandas nítidas, sendo 60 ISSRs com uma média de 4,3 bandas por *primer* e 30 IRAPs com uma média de 7,5 bandas por combinação de *primers*. Não ocorreu variação no padrão molecular entre plantas provenientes das três condições de cultivo para ambos os acessos. Os resultados obtidos confirmam a homogeneidade genética das plantas regeneradas por embriogênese somática por meio de marcadores ISSR e IRAP, indicando que para esta forma de propagação, as plantas de mandioca mostram-se geneticamente estáveis.

Palavras-chave: *Manihot esculenta* (Crantz), Cultivo *in vitro*, Fidelidade genética, Marcadores moleculares.

GENETIC STABILITY OF CASSAVA PLANTS REGENERATED BY SOMATIC EMBRYOGENESIS USING ISSR AND IRAP MARKERS

ABSTRACT: In micropropagation, variability is undesirable, since the fidelity of the clone is a prerequisite to begin *in vitro* culture of species of commercial interest. Therefore, the aim of this study was to verify the genetic stability of cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) derived from somatic embryos after two subcultures using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) molecular markers. Two cassava accessions (BGM 116 and BGM 1282) obtained from the Cassava Germplasm Bank at Embrapa Cassava and Fruits were used in this work. Plants regenerated by somatic embryogenesis were compared to the mother plant, represented by the plant in the field, and a plant grown *in vitro* derived from meristem. DNA extraction from plants from three growing conditions was carried out for each accession. Fourteen ISSR *primers* and four IRAP markers were selected and originated 90 bands, being 60 ISSR, with an average of 4.3 bands/*primer*, and 30 bands with IRAP markers with an average of 7.5 bands/*primer* combination. There was no variation in the molecular pattern between plant cultivation conditions for both accessions. The results confirm genetic stability of the regenerated plants by somatic embryogenesis using IRAP and ISSR markers, indicating that this form of cassava plant micropropagation is genetically stable.

Keywords: *Manihot esculenta* (Crantz), *In vitro* culture, Genetic stability, Molecular markers.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos de plantas vem sendo utilizada em diversas espécies vegetais, tendo como uma das aplicações práticas a propagação *in vitro*, uma vez que representa uma eficiente técnica para a propagação em larga escala (SANTANA et al., 2009, OGERO et al., 2012). Adicionalmente, vem sendo empregada em programas de melhoramento genético, conservação da biodiversidade e produção de biofármacos (GARCÍA-GONZÁLES et al., 2010).

Plantas produzidas *in vitro* devem apresentar as mesmas características em termos de padrão de qualidade das plantas produzidas pelo método convencional. Todavia, foi relatado que as condições de cultivo, como os meios de cultura, o número de subcultivos, os tipos de explantes, etc, podem provocar alterações genéticas em plantas cultivadas *in vitro* (WU et. al., 2012; FONSECA et. al., 2013).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie de grande importância como fonte produtora de carboidratos para cerca de um bilhão de pessoas em regiões tropicais e subtropicais. Além de ser utilizada para a produção de alimentos para animais e produtos à base de amido (FAN et al., 2011), apresenta resistência à seca e capacidade de produzir em solos de baixa fertilidade (OSÓRIO et al., 2012).

No caso da mandioca, metodologias de cultura de tecidos podem ser utilizadas para produzir material de alta qualidade. Um maior aumento de produtividade também pode ser obtido por meio da utilização de variedades genéticas resistentes a doenças e pragas ou a restrições ambientais (SANTANA et al., 2009). Neste sentido, a embriogênese somática pode ser uma alternativa capaz de maximizar a propagação da mandioca, tanto de cultivares já recomendadas para plantio como de híbridos oriundos de programas de melhoramento genético.

A embriogênese somática pode ocorrer por meio de duas vias distintas. A primeira é a chamada de embriogênese somática direta, em que os embriões somáticos se originam dos tecidos-matriz sem a formação de estádios intermediários de calos; a segunda é a embriogênese somática indireta, na qual os embriões somáticos se originam a partir de calo (GAJ, 2004). Segundo Bhatia et al. (2009), as variações somaclonais estão associadas à regeneração de tecidos indiferenciados e plantas regeneradas a partir de meristemas existentes são geneticamente estáveis.

Muitos estudos relatam a utilidade da combinação de marcadores moleculares para avaliar a fidelidade clonal de plantas provindas da cultura de

tecidos (PEREDO et al. 2009; KUMAR et al. 2011; SHARMA et al. 2011; LEVA; PETRUCCELLI, 2012; OSÓRIO et al. 2012), uma vez que oferecem respostas rápidas quando comparadas a outros métodos como avaliações das características morfológicas e técnicas citogenéticas (MANDAL et al., 2001; ABREU, 2010; BAIRU et al., 2011).

Dentre os marcadores moleculares, o *Inter-Simple Sequence Repeats* (ISSR) tem sido aplicado com sucesso em muitas espécies de plantas para detectar a homogeneidade do material derivado do cultivo *in vitro*, uma vez que regiões repetidas do genoma são consideradas mais eficientes para produção de marcadores cultivar-específico (PANDIT et al., 2007; NOOKARAJU; AGRAWAL, 2012; RAI et al., 2012). Os marcadores IRAP (*Inter-retrotransposon amplified polymorphism*), além de detectarem novas inserções em linhas regeneradas a partir da cultura *in vitro*, possuem a capacidade de distinção entre cultivares da mesma espécie (TEO et al., 2005). Ambos os marcadores são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), sem necessidade do uso de enzima de restrição, além de apresentarem alto nível de polimorfismo (KALENDAR; SCHULMAN, 2006; FALEIRO, 2007).

Desta forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar por meio dos marcadores moleculares, *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) e *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism* (IRAP), a estabilidade genética de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) derivadas de embriões somáticos seguida por dois subcultivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal foram utilizadas plantas de mandioca pré-estabelecidas *in vitro* dos acessos BGM 116 e BGM 1282 obtidas do Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA.

Embriogênese somática

Para a indução de embriões somáticos, plantas *in vitro* (Figura 1A) foram utilizadas para retirada de ápices caulinares (Figura 1B) e folhas jovens (Figura 1C), que foram cultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido ou não de glutamina (100 mg L^{-1}), sacarose (20 g L^{-1}) e sulfato de cobre ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), solidificado com Phytigel® ($2,4 \text{ g L}^{-1}$) e suplementado com picloram (4 e 8 mg L^{-1}), constituindo-se oito tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Fonte de explantes e composição do meio de cultivo dos tratamentos utilizados para multiplicação via embriogênese somática em dois acessos de mandioca (BGM 116 e BGM 1282).

	Tratamento		
	Fonte de explante	Glutamina (mg L^{-1})	Picloram (mg L^{-1})
T1	Ápice	0	4
T2	Ápice	0	8
T3	Ápice	100	4
T4	Ápice	100	8
T5	Folha	0	4
T6	Folha	0	8
T7	Folha	100	4
T8	Folha	100	8

Os explantes foram mantidos em ausência de luz e sob temperatura de 27 ± 1 °C. A formação de calo (Figura 1D) iniciou-se após 21 dias de cultivo.

A presença de embriões somáticos (Figura 1E) foi registrada em todos os tratamentos de indução após 150 dias de cultivo, quando foram transferidos para meio de maturação (MS, suplementado com 20 g L^{-1} de sacarose, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de sulfato de cobre e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (LI et al., 1998) durante doze semanas (Figura 1F). Posteriormente, foram transferidos para meio de germinação composto MS acrescido de 20 g L^{-1} de sacarose, $2 \mu\text{M}$ de sulfato de cobre, suplementado com $1,77 \mu\text{M}$ de BAP (ZHANG et al., 2000), permanecendo nessas condições por pelo menos quatro semanas (Figura 1G).

Houve formação de embriões somáticos em todos os tratamentos de indução no qual os explantes (ápice e folha) de ambos os acessos foram submetidos. No

entanto, a regeneração de plantas foi registrada apenas nos tratamentos T2, T5 e T6 do acesso BGM 116 e T8 do acesso BGM 1282.

As plantas representadas pelas Figuras 1H e 1I apresentaram desenvolvimento normal e foram transferidas para meio de micropropagação composto por 1/3 dos macro e micronutrientes do MS, suplementado com 0,35 mg L⁻¹ de tiamina, 35 mg L⁻¹ de inositol, 0,01 mg L⁻¹ de ANA, 0,01 mg L⁻¹ de GA₃ e 20 g L⁻¹ de sacarose (CIAT, 1982) e solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel[®], permanecendo nessas condições até o completo desenvolvimento das plantas, o que compreendeu um período de 60 dias.

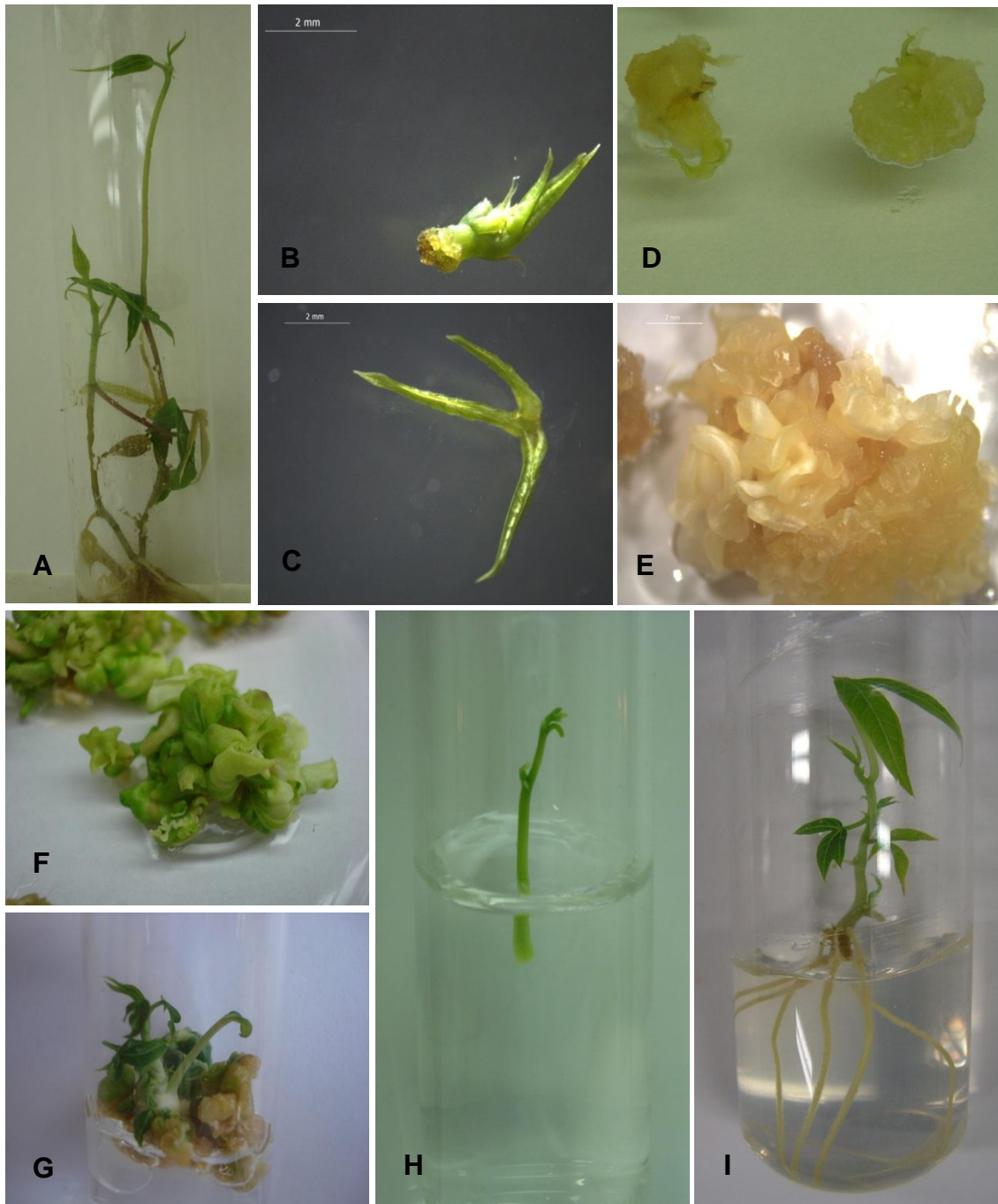


Figura 1. Embriogênese somática em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): planta doadora de explantes, BGM 116 (A); ápice caulinar (B) e folha imatura (C) em meio de indução; calos originados dos explantes (D); embriões somáticos (E); embriões somáticos em meio de maturação (F); embriões somáticos em meio de germinação (G); microestaca recém-cultivada em meio de multiplicação (H) e planta regenerada (I).

De cada tratamento que originou planta ao final do processo da embriogênese, foram selecionadas três plantas, as quais foram multiplicadas por dois subcultivos em intervalos de 60 dias (Tabela 2).

Tabela 2. Número de plantas embriogênicas selecionadas (NPES), número de plantas selecionadas no primeiro subcultivo (NP1^oS), número de plantas obtidas no segundo subcultivo (NP2^oS) e número de plantas total (NPTotal) dos acessos de mandioca BGM116 e BGM 1282.

Acesso – Tratamento	NPES	NP1 ^o S	NP2 ^o S	NPTotal
BGM 116 - T2	3	9	25	37
BGM 116 – T5	3	9	21	33
BGM 116 – T6	3	9	23	35
BGM 1282 – T8	3	9	26	38

Extração de DNA

Tecidos foliares de plantas de mandioca em três condições de cultivo: campo, meristema e embriogênese (NPTotal – Tabela 2) foram utilizadas como material vegetal para a extração de DNA conforme protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 0,8% e visualizadas sob luz ultra violeta. O DNA foi diluído para a concentração de 5 ng/μl para utilização nas reações de PCR.

Amplificação com ISSR

A amplificação foi realizada utilizando 22 *primers* ISSR (Tabela 3) em reação com volume final de 15 μl contendo 0,2 mM de dNTP, tampão 1x, 2,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 0,4 mM de *primer* e 10 ng/μL de DNA genômico.

O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min., seguido por 39 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min., anelamento a 50 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 1 min., seguido de extensão final por 10 min. a 72 °C e 14 °C ∞. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em agarose

2,5% em 0,5X tampão TBE. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultra violeta.

Tabela 3. Relação de *primers* ISSR utilizados na amplificação de DNA e sequência.

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')
ISSR 12*	GAGAGAGAGAGAGAGARC
ISSR 24	AGTGTGTGTGTGTGTGT
ISSR 25	CGTGTGTGTGTGTGTGT
ISSR 33	CAGCAGCAGCAGCAG
ISSR 34*	CAGCAGCAGCAGCAGRC
ISSR 36	CRCAGCAGCAGCAGCAG
ISSR 37*	CYCAGCAGCAGCAGCAG
ISSR 39	GTGGTGGTGGTGGTGRC
ISSR 40*	GTGGTGGTGGTGGTGYC
ISSR 41	CRGTGGTGGTGGTGGTG
ISSR 42*	CYGTGGTGGTGGTGGTG
ISSR 47	CYTGTTGTTGTTGTTGT
ISSR 58*	ACGACGACGACGACGRC
ISSR 59*	AGAAGAAGAAGAAGARC
ISSR 69	TTGTTGTTGTTGTTGRC
ISSR 83	CTGCTGCTGCTGCTGRC
ISSR 86	CGACGACGACGACGARC
ISSR 90	GAAGAAGAAGAAGAARC
ISSR 91	GATGATGATGATGATRC
ISSR 92	GACGACGACGACGACRC
ISSR 93*	GAGGAGGAGGAGGAGRC
ISSR 94	GTAGTAGTAGTAGTARC

**Primers* que não apresentaram amplificação.

Amplificação com marcadores IRAP

A amplificação foi realizada utilizando-se seis *primers* IRAP (Tabela 4) combinados entre si, em uma reação com volume final de 15 µl contendo 0,2 mM de dNTP, tampão 1x, 2 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 0,5 mM de *primer* e 10 ng/µL de DNA genômico.

O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min., seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min., anelamento a 50 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 2 min., seguido de extensão final por 10 min. a 72 °C e 14 °C ∞. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em agarose 2,5% em 0,5X tampão TBE. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultra violeta.

Tabela 4. Relação de *primers* IRAP utilizados, combinação entre *primers* e temperatura de anelamento (Ta).

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Combinação de <i>primers</i>	Ta (°C)
LTR 6150	CTGGTTCGGCCC ATGTCTATGTATC CACACATGTA	LTR 6150 + 3' LTR	45,5
3' LTR	TGTTTCCCATGC GACGTTCCCCAA CA	Reverse TY1 + 3' LTR	47
Nikita LTR	CGCATTTGTCAA GCCTAAACC	3' LTR + Nikita LTR	47
Sukkula LTR	GATAGGGTCGCA TCTTGGGCGTGA C	Reverse TY2 + Sukkula LTR	48,4
Reverse TY1	CCYTGNAYYAAN GCNGT		
Reverse TY2	TRGTARAGRAGN TGRAT		

Análise dos dados

Foram considerados apenas os fragmentos polimórficos e nítidos de DNA. A contagem das bandas foi feita com base na sua presença, representada por '1' ou ausência, representada por '0', no gel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 22 *primers* ISSR dos quais 14 produziram um total de 60 bandas nítidas. O número de bandas para cada iniciador variou de um a oito com uma média 4,3 bandas por *primer* (Tabela 5).

Tabela 5. *Primers* ISSR, número de produtos amplificados e número de bandas polimórficas de plantas dos acessos de mandioca BGM 116 e BGM 1282 oriundas de diferentes condições de cultivo.

<i>Primer</i>	Total de bandas	Bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
ISSR 24	5	1	20
ISSR 25	4	1	0
ISSR 33	8	0	0
ISSR 36	8	0	0
ISSR 39	2	0	0
ISSR 41	5	1	20
ISSR 47	3	1	33,3
ISSR 69	1	0	0
ISSR 83	6	1	16,6
ISSR 86	1	0	0
ISSR 90	3	1	33,3
ISSR 91	5	1	20
ISSR 92	4	1	25
ISSR 94	5	4	80
Total	60	11	18,3
Média	4,3	0,8	17,7

Dos 14 *primers* ISSR, nove apresentaram bandas polimórficas entre os acessos BGM 116 e BGM 1282, enquanto que dentro de cada acesso, não ocorreu variação no padrão molecular nas plantas derivadas das três condições de cultivo, fossem elas regeneradas a partir de embriões somáticos, planta do campo (planta-mãe), ou derivadas de meristemas, para todos os *primers* (Figura 2).

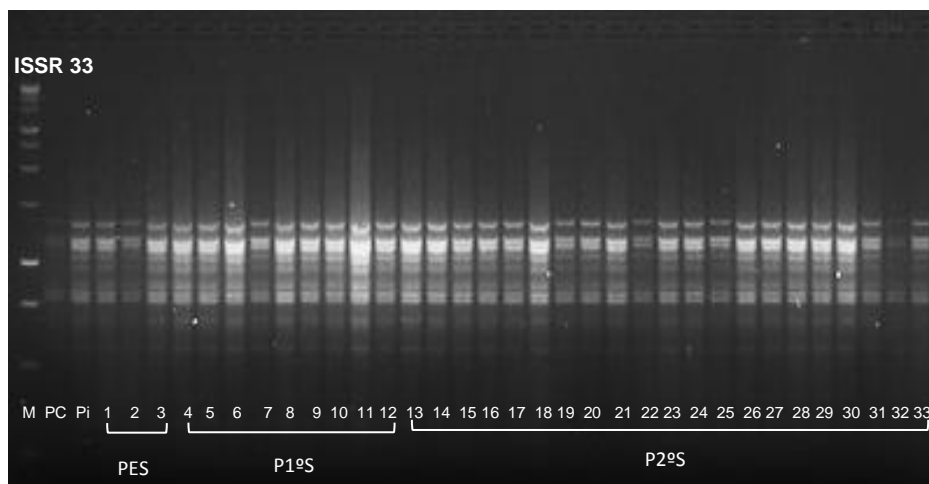


Figura 2. Perfil eletroforético do *primer* ISSR 33 em plantas de mandioca BGM 116 obtidas sob diferentes condições de cultivo (plantas provindas do tratamento T5): M= 1Kb; PC= planta do campo (planta-mãe); PI= planta mantida *in vitro* derivada de meristema; PES= planta derivada da embriogênese somática; P1ºS= planta do primeiro subcultivo; P2ºS= planta do segundo subcultivo. 1-3= planta derivada de embriões somáticos; 4-12= plantas do 1º subcultivo e 13-33= plantas do 2º subcultivo.

Em estudos preliminares foram utilizados nove *primers* IRAP em 16 combinações, dos quais apenas seis *primers* com quatro combinações geraram bandas nítidas e contáveis. O menor número de bandas (seis) foi obtido para a combinação LTR 6150 + 3' LTR e Reverse TY2 + Sukkula LTR, enquanto a combinação dos *primers* 3' LTR e Nikita LTR gerou o maior número (10), com uma média 7,5 bandas por *primer* (Tabela 6).

Tabela 6. Combinação entre *primers* IRAP, número de produtos amplificados, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo em plantas de mandioca regeneradas a partir de embriões somáticos.

Combinação de <i>primers</i>	Total de bandas	Bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
LTR 6150 + 3' LTR	6	0	0
Reverse TY1 + 3' LTR	8	4	50
3' LTR + Nikita LTR	10	6	60
Reverse TY2 + Sukkula LTR	6	2	33,3
Total	30	12	40
Média	7,5	3	35,8

O padrão de bandas monomórficas geradas por *primers* IRAP em plantas derivadas de embriões somáticos, bem como de plantas derivadas de meristemas e do campo, a princípio, confirma a homogeneidade genética das plantas originadas por embriogênese somática (Figura 3).

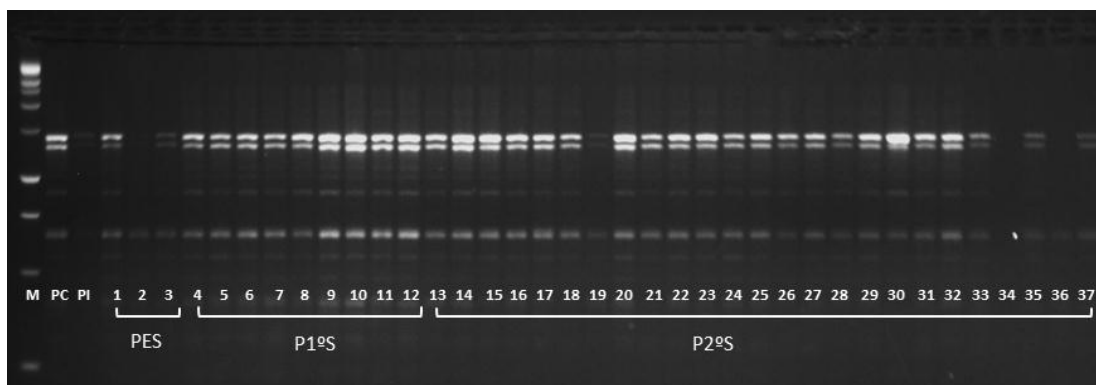


Figura 3. Perfil eletroforético da combinação do *primers* IRAP 3' LTR com Nikita LTR de plantas de mandioca do acesso BGM 116 (plantas provindas do tratamento T2) obtidas sob diferentes condições de cultivo. M= 1Kb; PC= planta do campo (planta-mãe); PI= planta derivada de meristema; PES= planta derivada da embriogênese somática; P1ºS= planta do primeiro subcultivo; P2ºS= planta do segundo subcultivo. 1-3= planta derivada de embriões somáticos; 4-12= plantas do 1º subcultivo e 13-37= plantas do 2º subcultivo.

Vários autores têm utilizado marcadores moleculares para verificar a fidelidade genética de plantas oriundas da cultura de tecidos, a exemplo de Venkatachalam et al. (2007) com RAPD e ISSR em bananeira; Huang et al. (2009) com ISSR em *Platanus acerifolia*; Kumar et al. (2011) com RAPD e ISSR em jojoba. Na maioria das vezes, os autores utilizam mais de uma técnica de amplificação de DNA, pois há a possibilidade de surgirem diferentes níveis de polimorfismo, como registrado por Palombi e Damiano (2002) que compararam marcadores RAPD e SSR na detecção de variação genética em plântulas de Kiwi. Esses autores relataram que a técnica de RAPD não detectou variação genética em plantas micropropagadas de gérbera, enquanto os marcadores SSR foram mais polimórficos e tiveram maior capacidade de detectar mudanças entre os genótipos.

Rai et al. (2012), utilizando os marcadores ISSR e SSR, também obtiveram padrões de bandas monomórficas em plantas micropropagadas e da planta-mãe ao

avaliarem a homogeneidade genética de plantas de goiabeira de um ano de idade desenvolvidas a partir de embriogênese somática, demonstrando a confiabilidade desse sistema de propagação *in vitro*.

Segundo Palombi e Damiano (2002) em estudos de variação genética em plantas originadas da cultura *in vitro*, a escolha do marcador molecular é importante e depende da eficiência dos marcadores em detectar o polimorfismo e os diferentes níveis de alterações do DNA que ocorrem nas plantas. Rai et al. (2012) utilizaram marcadores ISSR, devido à alta reprodutibilidade e confiabilidade podendo ser utilizados de forma eficiente para determinar a homogeneidade genética entre plantas oriundas da cultura de tecidos. Por sua vez, os marcadores IRAP possuem elevada abundância e versatilidade, e são úteis para detectar rápidas mudanças no genoma (SMÝKAL et al., 2007).

Para Bayram et al. (2012) a cultura *in vitro* pode ser considerada como um dos fatores de estresse que causam o efeito estimulante sobre a ativação de elementos de retrotransposons.

Neste estudo, as plantas foram regeneradas por meio da embriogênese somática indireta, que envolve a passagem pela fase de calo. Segundo Rai et al. (2012), o sistema de embriogênese somática direta é geneticamente mais estável do que aqueles em que a regeneração ocorre via calo. Da mesma forma, Pescador et al. (2008) consideram a fase obrigatória de calo da embriogênese indireta como um dos notáveis fatores nas mudanças estruturais detectadas durante a embriogênese somática em *Acca sellowiana*. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não revelaram nenhuma diferença nas plantas obtidas a partir dos embriões somáticos, seja com o uso do ISSR ou IRAP. Esses resultados estão de acordo aos obtidos por Smýkal et al. (2007) que também utilizaram os marcadores ISSR e IRAP para avaliar a estabilidade genética em longo prazo de brotos *in vitro* na cultura de ervilha e não encontraram diferenças entre as plantas, ainda que as mesmas tivessem sido mantidas por um período de cultivo muito longo.

Resultados semelhantes foram obtidos por Campbell et al. (2011) que utilizaram marcadores ISSR e IRAP para detectar a variação somaclonal induzida por cultura de tecidos em três cultivares de cevada. Para ambos os marcadores, foram detectadas novas bandas polimórficas e não parentais. A análise de agrupamento revelou que o nível de polimorfismo e variabilidade genética detectada foi comparável entre os dois marcadores, sugerindo que os sistemas baseados em

marcadores retrotransposons, como IRAPs, são ferramentas valiosas para a caracterização detalhada de perfis de mutação que surgem durante a cultura de tecidos, enquanto Temel e Gozukirmizi (2013), que utilizaram marcadores IRAP para investigar o movimento de retrotransposons na cultura de calos de cevada com 15 e 30 dias de idade, encontraram padrões IRAP bastante monomórficos.

Assim como a embriogênese somática, sobretudo a via indireta, foi descrita como uma das fontes de instabilidade genética, os tipos de explantes associados ao tempo de cultivo, e alguns componentes do meio de cultura, também são alvo de estudo na avaliação da fidelidade genética de muitas espécies de plantas provenientes do cultivo *in vitro*.

Zoghiami et al. (2012) utilizaram marcadores RAPD para avaliar o nível de estabilidade genética em plantas de *Opuntia ficus-indica* L. Mill. micropropagadas a partir de ramos axilares e mantidas em condições *in vitro* por cinco anos. Nesse estudo foi detectado baixo nível de instabilidade genética com 2,79% da variação genética total. Levando em consideração o tempo de cultivo *in vitro*, os estudos revelaram que o método de multiplicação por ramo axilar é altamente confiável, demonstrando a estabilidade genética da cultura. Já Leva e Petruccelli (2012) utilizando os marcadores RAPD e ISSR, não encontraram diferenças entre as plantas de oliveira regeneradas por botões axilares e a planta doadora. Da mesma forma, Huang et al. (2009) utilizaram marcadores ISSR para avaliar a estabilidade genética de plantas micropropagadas de *Platanus acerifolia* provenientes de uma coleção clonal mantida *in vitro* por oito anos e as análises revelaram apenas 2,88% de polimorfismo entre as plantas, indicando que *P. acerifolia* mostrou-se geneticamente estável.

Embora a fonte de explantes e tempo de cultivo tenham sido relatados como possíveis fontes de variações genéticas em plantas cultivadas *in vitro*, nos trabalhos acima descritos, parece que esses fatores não influenciaram na estabilidade das plantas. Contudo, estudos realizados por Bhatia et al. (2009), revelaram algum grau de variação em clones derivados de folhas de plantas de gérbera provenientes de capítulo, folhas e brotos, utilizando marcadores ISSR. No entanto, morfológicamente, todos os clones foram semelhantes à planta-mãe, indicando não haver variações.

No presente trabalho foram utilizadas duas fontes distintas de explantes (folhas e ápices) sem a ocorrência de variação no padrão molecular entre a planta-mãe e

plantas regeneradas/subcultivadas em ambas as fontes de explantes utilizando marcadores do tipo ISSR e IRAP.

Venkatachalam et al. (2007) sugerem que variações somaclonais podem surgir como resultado da interação da fonte de explantes, as condições de cultivo e genótipo. Contudo, Pathak; Dhawan (2012) descreveram alguns trabalhos os quais sugeriram que a variação é regulada mais pelo genótipo do que pelas condições de cultivo. Nesse sentido, Bordallo et al. (2004) detectaram alto nível de variação genética entre as cinco cultivares de batata avaliadas a partir da cultura de calos, que foram induzidos a partir de explantes de folha e caule, em meio de cultura contendo dois tipos de auxina (picloram ou 2,4-D). As análises realizadas por meio de RAPD revelaram que uma das cinco variedades estudadas apresentou um alto número de fragmentos polimórficos para os tratamentos, não sendo recomendado para produção de sementes sintéticas.

Assim sendo, no presente estudo, pôde-se observar que a fonte de explante e a via de regeneração dos embriões somáticos por meio de calo, bem como as condições de cultivo do tratamento de indução, não influenciaram na estabilidade das plantas oriundas da embriogênese somática de ambos os acessos de mandioca, demonstrando a eficiência nesse sistema de regeneração.

CONCLUSÕES

Plantas de mandioca regeneradas a partir de embriogênese somática mostraram-se geneticamente estáveis, validando a confiabilidade no sistema de propagação.

Os marcadores ISSR e IRAP podem seguramente serem utilizados para determinar a estabilidade genética de plantas de mandioca regeneradas a partir de embriões somáticos.

REFERÊNCIAS

BAYRAM, E.; YILMAZ, S.; HAMAT-MECBUR, H.; KARTAL-ALACAM, G.; GOZUKIRMIZI, N. Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Omics**, v. 5, n. 3, p. 211-215, 2012.

CAMPBELL, B. C.; LeMARE, S.; PIPERIDIS, G.; GODWIN, I. D. IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley. **Molecular Breeding**, v. 27, n. 2, p. 193-206, 2011.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). El cultivo de meristemas para saneamiento de clones de yuca. **Guía de estudio**. Serie 04SC-02.05. Cali, Colombia. 1982. 45p.

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

FAN, M.; LIU, Z.; ZHOU, L.; LIN, T.; LIU, Y.; LUO, L. Effects of plant growth regulators and saccharide on *in vitro* plant and tuberous root regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, n.1, p. 11-19, 2011.

HUANG, W. J.; NING, G. G.; LIU, G. F.; BAO, M. Z. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 159-163, 2009.

KUMAR, S.; MANGAL, M.; DHAWAN, A. K.; SINGH, N. Assessment of genetic fidelity of micropropagated plants of *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider using RAPD and ISSR markers. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 2541-2545, 2011.

LEVA, A. R.; PETRUCCELLI, R. Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 2, p. 373-376, 2012.

LI, H-Q.; GUO, J. Y.; HUANG, Y. W.; LIANG, C. Y.; LIU, H. X.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 410-414, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

OSÓRIO, M.; GÁMEZ, E.; MOLINA, S.; INFANTE, D. Evaluation of cassava plants generated by somatic embryogenesis in different stages of development using molecular markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 1-11, 2012.

PALOMBI, M. A.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 11, p. 1061-1066, 2002.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 31, n. 1, p. 155-164, 2008.

RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; HARISH; GUPTA, A. K.; SHEKHAWAT, N. S.; JAISWAL, U. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 111, p. 259–264, 2012.

SMÝKAL, P. L.; VALLEDOR, L.; RODRÍGUEZ, R.; GRIGA, M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 11, p. 1985–1998, 2007.

TEMEL, A.; GOZUKIRMIZI, N. Analysis of retrotransposition and DNA methylation in barley callus culture. **Acta Biologica Hungarica**, v. 64, n. 1, p. 86-95, 2013.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. **In vitro Cellular Developmental Biology-Plant** , v. 43, p. 267-274, 2007.

ZHANG, P. *et al.* Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 939-945, 2000.

ZOGLAMI, N.; BOUAMAMA, B.; KHAMMASSI, M.; GHORBEL, A. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 59-64, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, buscou-se avaliar a calogênese e o potencial morfogênético de calos de diferentes acessos de mandioca (BGM 116, BGM 264, BGM 576 e BGM 1282) provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, bem como a capacidade desses acessos em gerar embriões somáticos. Ficou claro e evidente o efeito do genótipo na capacidade morfogênica e embriogênica desses acessos, uma vez que os acessos em estudo apresentaram comportamentos diferenciados quando submetidos às mesmas condições de cultivo. Na fase de indução e multiplicação dos calos todos os acessos responderam às condições impostas, no entanto, apenas três dos quatro acessos (BGM 116, BGM 264 e BGM 1282) utilizados foram capazes de produzir embriões somáticos e desses três, apenas dois (BGM 116 e BGM 1282) avançaram para a fase de conversão em plantas. Além do efeito do genótipo entre os acessos estudados, observou-se que dentro de cada acesso também existem diferenças nas respostas aos tratamentos da embriogênese, o que de certa forma, dificulta o estabelecimento de um protocolo que se adeque ao maior número de variedades.

Ficou demonstrado, que a mandioca é capaz de submeter-se à embriogênese, contudo a taxa de plantas regeneradas ainda é baixa quando comparada a outros métodos de regeneração. Dessa forma, estudos específicos que visem potencializar os processos de desenvolvimento *in vitro*, tornam-se necessários, como a adequação do tempo e da concentração de auxina utilizada na fase de indução, associada ao estágio de maturação do embrião, são essenciais para qualidade do embrião somático, visando uma maior taxa de regeneração em plantas. O protocolo desenvolvido neste trabalho pode, entretanto, ser uma ferramenta útil como protocolo de regeneração em trabalhos de transformação genética.

Além do estudo da embriogênese somática foi avaliada a fidelidade genética de plantas de mandioca regeneradas por dois sistemas de regeneração *in vitro*, o

cultivo de meristemas e a embriogênese somática, utilizando dois marcadores moleculares.

O uso dos marcadores moleculares na avaliação da fidelidade genética de plantas provenientes do cultivo de meristemas bem como das plantas oriundas da embriogênese somática foram eficientes. Dos 22 acessos avaliados, 19 apresentaram uniformidade entre plantas do mesmo acesso mantidas em campo e as provenientes do cultivo de meristemas. Nos acessos restantes há a possibilidade de ter ocorrido variação somaclonal, contudo, para ter certeza de tal hipótese, é necessária a repetição destas análises, bem como a utilização de outras técnicas que possam confirmar a possível variação.

No caso das plantas oriundas da embriogênese somática, os dois marcadores utilizados revelaram uniformidade destas e as plantas do campo e as oriundas de meristemas, demonstrando a possibilidade de regenerar a mandioca por esta via.

A demonstração da estabilidade genética das plantas produzidas reforça a confiança no uso dessas ferramentas como apoio ao melhoramento genético da mandioca, tanto na produção de mudas, por micropropagação como na regeneração de plantas por embriogênese somática.