

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

**ANÁLISES MOLECULARES EM GENES DA ROTA
METABÓLICA DO AMIDO E CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA DE ACESSOS DE MANDIOCA**

LETÍCIA MARÓSTICA DE VASCONCELOS

**CRUZ DAS ALMAS / BAHIA
2016**

ANÁLISES MOLECULARES EM GENES DA ROTA METABÓLICA DO AMIDO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ACESSOS DE MANDIOCA

Letícia Maróstica de Vasconcelos

Bióloga

Universidade Federal de Uberlândia, 2012

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientador: Dr. Eder Jorge de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS / BAHIA
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

| | |
|-------|---|
| V331a | <p>Vasconcelos, Leticia Maróstica de.</p> <p>Análises moleculares em genes da rota metabólica do amido e caracterização fenotípica de acessos de mandioca / Leticia Maróstica de Vasconcelos. _ Cruz das Almas, BA, 2016.</p> <p>77.; il. + 1 CD-ROM</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Mestrado em Ciências Agrárias.</p> <p>1.Mandioca – Melhoramento. 2. Mandioca – <i>Manihot esculenta</i> Crantz. 3. Mandioca – biossíntese.</p> <p>I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 633.682</p> |
|-------|---|

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

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

**ANÁLISES MOLECULARES EM GENES DA ROTA
METABÓLICA DO AMIDO E CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA EM ACESSOS DE MANDIOCA**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Letícia Maróstica de Vasconcelos**

Realizada em 29 de Agosto de 2016

Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Interno (Orientador)

Profa. Dra. Simone Alves Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Interno

Dr. Onildo Nunes de Jesus
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dedico com todo amor e carinho ao meu paizinho Josias (em memória), agradeço pela educação, exemplo de luta e força.

À minha mãe por ser meu tudo, minha luz, pelo amor incondicional, pelo exemplo de força, por ser essa mulher de fibra. Eu **ofereço**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo amparo e orientação espiritual, pelo acalento e luz durante esta jornada.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, em especial ao coordenador Dr. Carlos Alfredo.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pelo apoio financeiro e infraestrutura.

À coordenação de aperfeiçoamento profissional (Capes) pela bolsa de estudo concedida.

Ao meu orientador Dr. Eder Jorge, pela exigência, pelo exemplo ético e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), por todo apoio e auxílio durante todo o desenvolvimento do trabalho. Aos técnicos Raimundo e Vadeson (Só alegria!). Um agradecimento especial a analista Andresa, por todo suporte técnico, auxílio e amizade.

A todos os funcionários da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial ao motorista “Bodinho”, por ser tão prestativo. À equipe mandioca, em especial ao Ricardo pelo auxílio nas análises de microscopia e compostos cianogênicos.

Ao mestrando Paulo Henrique, pelo seu comprometimento, auxílio e disponibilidade em me ajudar em momentos decisivos do trabalho.

À pós doutoranda Ana Carla, pelos auxílios nas análises dos dados, correções, discussões do trabalho e paciência.

À doutoranda Cátia, a minha “mamuska” que foi peça fundamental para a execução desse trabalho, por me guiar durante todo esse período, pelos ensinamentos técnicos, teóricos e práticos, pela partilha de conhecimentos, por muitas vezes deixar de fazer seu trabalho para me ajudar. Serei eternamente grata!

Ao grupo chora rita, pelo momentos de descontração, amizade, e leituras de “artigos” no bom e velho “Doguito’s”.

Às amigas realizadas durante o mestrado, Camila, Lucas, Paulo Henrique e Zanon, por dividir conversas, experiências e perrengues. À amiga Ariana, que tanto me ouviu durante todo esse tempo, obrigada por todo carinho.

Aos amigos Bruna, Eliézer, Lucas, Maria Carolina e Nathâny, mesmo enfrentando essa longa distância, nossa amizade só se fortalece. Um agradecimento especial à minha manola Mardiany, por ser minha parceira durante os longos anos de graduação, sempre me arrancando longas gargalhadas.

Aos amigos de sempre e pra sempre: Aline, Dayane, Paulo, Ricardo e Robison, agradeço pelas décadas de amizade, cada um com sua particularidade me fazem crescer moralmente e espiritualmente. Amo vocês!

Às minhas ex-orientadoras Dani e Gabi, por despertarem o amor e curiosidade do mundo científico e incentivo constante.

À família Lima, em especial à minha querida sogra Maria Norlia, pelo acolhimento nos últimos meses, carinho, orações, pelos deliciosos cozidos e quiabadas, pelo colo e ombro amigo.

Ao meu namorado Rafael, por ser meu companheiro durante esta caminhada, pelo apoio, por entender minhas ausências e tristezas, pela ajuda, incentivo e amor.

Aos meus pais, Josias e Izonete, pelos valores e educação compartilhados, amor incondicional, pelo exemplo de vida, por serem meu porto seguro, minha eterna gratidão. Ao meu irmão Leonardo pelo apoio e incentivo.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. **Gratidão!**

Quando você conseguir superar problemas graves não se detenha na lembrança dos momentos difíceis, mas na alegria de haver atravessado mais essa prova em sua vida.

Quando sair de um longo tratamento de saúde, não pense no sofrimento que foi necessário enfrentar, mas na benção de Deus que permitiu a cura.

Leve na sua memória, para o resto da vida, as coisas boas que surgiram nas dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade e lhe darão confiança diante de qualquer obstáculo...

Chico Xavier

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| REFERENCIAL TEÓRICO | |
| ARTIGO 1 | |
| POLIMORFISMO EM GENES DA ROTA METABÓLICA DO AMIDO DE MANDIOCA | 19 |
| ARTIGO 2 | |
| DIVERSIDADE FENOTÍPICA PARA CARACTERÍSTICAS DE AMIDO EM GERMOPLASMA DE MANDIOCA | 49 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 77 |

ANÁLISES MOLECULARES EM GENES DA ROTA METABÓLICA DO AMIDO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ACESSOS DE MANDIOCA

Autora: Letícia Maróstica de Vasconcelos

Orientador: Dr. Eder Jorge de Oliveira

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em seis genes envolvidos na biossíntese de amido em mandioca utilizando 96 acessos, bem como estimar a diversidade genética dos acessos para características de raízes e grânulos de amido. Também foram avaliados 56 acessos de mandioca para número de grânulos em 1 g de amido (NGT); área (AG, em μm^2), comprimento (CG, em μm), largura (LG, em μm) e grau de arredondamento dos grânulos de amido (Round); teor de matéria seca nas raízes (MS, em %); cor da polpa (CP) e compostos cianogênicos (HCN). Em média foram identificados um SNP para cada 147 e 171 pares de bases nas regiões codificadoras e não-codificadoras, respectivamente, além de um total de 13 loci heterozigóticos. Os acessos foram agrupados pelo método *Neighbor Joining* (NJ), formando cinco grupos, porém sem uma associação com teor de matéria seca e outras características das raízes de mandioca. Diferenças significativas foram encontradas entre os acessos de mandioca para todas as características quantitativas relacionadas ao grânulo de amido. Correlações positivas e de elevada magnitude foram observadas entre as características AG x LG (0,98), AG x CG (0,98) e entre LG x CG, e correlação negativa de moderada magnitude foi observada entre as características CorPolpa x MS. Os grânulos de amido foram homogêneos e com predominância de formas circulares e truncadas. A identificação dos SNPs em genes da biossíntese do amido pode ser utilizada na busca de associações com propriedades funcionais do amido. Acessos com características diferenciadas de raízes e grânulos de amido foram identificados e sugestões de cruzamentos foram propostos.

Palavras-chave: Melhoramento, *Manihot esculenta* Crantz, SNP, biossíntese, raiz.

PHENOTYPIC ANALYSES AND MOLECULAR VARIATIONS OF STARCH PATHWAY GENES IN CASSAVA

Author: Leticia Maróstica Vasconcelos

Advisor: Dr. Eder Jorge de Oliveira

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in six genes involved in starch biosynthesis in cassava by using 96 cassava accessions as well as to estimate the genetic diversity of accessions for root and starch granules characteristics. Concerning the starch granules, starches from 56 accessions were evaluated for the number of granules in 1 g of starch (NTG); area (AG, μm^2), length (LG, in μm), width (WG, in μm), and starch granules roundness (Round); and also dry matter content in the roots (DMC, in wt%); pulp coloration (PulC) and cyanogenic compounds (HCN). On average one SNP was identified for each 147 and 171 base pairs in the coding and noncoding regions, respectively, and a total of 13 heterozygous loci. The accessions were grouped according to the Neighbor Joining method (NJ), and five clusters were identified, but without an association with the dry matter content and other characteristics of cassava roots. Significant differences between the cassava accessions for all variables measured showed wide variability of cassava starch granule characteristics. High and positive correlations were observed between AG x WG (0.98), AG x LG (0.98), and WG x LG (0.99), while negative correlation of moderated magnitude was observed between PulC x DMC (-0.43). The starch granules were homogeneous and predominantly with circular and truncated forms. The identification of SNPs in the starch biosynthetic genes can be used to detect associations with the functional properties of starch. Accessions with differential characteristics of roots and starch granules were identified and crossing suggestions has been proposed.

Key words: breeding, *Manihot esculenta* Crantz, SNP, biosynthesis, root.

REFERENCIAL TEÓRICO

Classificação botânica e Origem

A mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, subclasse Archiclamydeae, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, tribo Manihoteae, gênero *Manihot* e à espécie *M. esculenta* (FUKUDA & IGLESIAS, 2006). No gênero *Manihot* são descritas 98 espécies (ORLANDIN & LIMA, 2014) das quais 76 ocorrem no Brasil (66 endêmicas) (CORDEIRO et al., 2016; FIALHO & VIEIRA, 2011). Dentre as espécies do gênero, a *M. esculenta* é a única cultivada comercialmente.

A mandioca é considerada perene, arbustiva, e possui uma elevada adaptabilidade às mais variadas condições de solo e clima. A importância econômica da mandioca se deve à produção de raízes tuberosas, por apresentar alto teor de carboidratos (amido). Há evidências de que a domesticação desta espécie ocorreu na América Latina, mais exatamente no sudoeste da Amazônia sendo levada para o continente africano pelos europeus e em seguida, ao continente asiático (CEBALLOS et al., 2004).

Algumas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de esclarecer a origem e o centro de domesticação da mandioca, como os trabalhos desenvolvidos por Olsen e Schaal (2001) que mostraram que a cultura evoluiu a partir da espécie silvestre *M. flabellifolia* e que os Estados de Mato Grosso e Rondônia são o provável centro de domesticação devido à presença conjunta de populações de mandioca cultivada e espécies silvestres. Outros estudos como os de Olsen e Schaal (2001) e Olsen (2004) objetivaram esclarecer a origem da mandioca, utilizando marcadores microssatélites e polimorfismos de base única (SNPs). Estes autores propuseram que a espécie *M. esculenta* se originou no sul da Amazônia e que a *M. flabellifolia* é ancestral da espécie cultivada. Trabalhos desenvolvidos por Carvalho e Schaal (2001) também confirmaram a proximidade genética de *M. esculenta* e *M. flabellifolia* ao considerarem aspectos genéticos e filogenéticos de *M. esculenta*, *M. flabellifolia* e *M. pilosa*. Contudo, estudos sobre a origem da espécie cultivada e sobre a filogenia do gênero ainda

não foram conclusivos mesmo com a utilização de marcadores moleculares (CHACÓN et al., 2008).

Distribuição geográfica e Importância econômica

A produção mundial está acima de 230 milhões de toneladas, constituindo-se como um dos principais produtos agrícolas. Dentre os continentes, a África é o maior produtor mundial com 52,82% da produção, seguido pela Ásia com 32,64%, Américas com 14,44% e Oceania com 0,09% (FAO, 2014). O Brasil ocupa a quarta posição na produção mundial de mandioca com produção de cerca de 23 milhões de toneladas e produtividade média de 14,1 t ha⁻¹ (FAO, 2014). Dentre as regiões produtoras destaca-se a região Norte com 31,30%, sendo o estado do Pará (19,70%) o maior produtor. O Nordeste brasileiro é responsável por 29,80% da produção, destacando os estados da Bahia (10,10%) e Maranhão (7,00%). A região Sul produz 23,20%, sendo os estados do Paraná (16,60%) e Rio Grande do Sul (5,00%) os de maior destaque. Na quarta posição está o Sudeste com 10,10%, sendo o estado de São Paulo (4,80%) o maior produtor. O Centro Oeste é quinto colocado com 5,50%, sendo o estado do Mato Grosso do Sul (2,80%) o maior produtor da região (IBGE, 2013).

A mandioca é caracterizada por apresentar ampla diversidade genética o que contribui para sua adaptação a condições edafoclimáticas extremas (NICK et al., 2010), principalmente em regiões com baixo índice pluviométrico e solos deficientes (HERRERA-CAMPO et al., 2011). É uma das culturas mais exploradas na agricultura mundial, e dentre as tuberosas utilizadas na alimentação humana é superada apenas pela batata inglesa (SOUZA & OTSUBO, 2002). Pode ser utilizada sob as mais diferentes formas e seus coprodutos são utilizados na indústria, principalmente, considerando o amido fermentado (polvilho); *in natura* (papel, alimentos para bebê, álcool, goma para tecidos, fermento químico, tapioca/sagu) e, modificado (papelão, sorvetes, xarope, pudins, adoçante, vitamina C e plásticos biodegradáveis) (CEBALLOS, 2002). O elevado teor de amido (20-40%) faz da mandioca uma fonte de energia desejável tanto para a alimentação humana quanto para aplicações industriais: biocombustíveis, papel, têxteis, madeira, adesivos, álcool, cosméticos e

produtos farmacêuticos (BALAT & BALAT 2009; FAO, 2008; SCHMITZ & KAVALLARI, 2009; RONGSIRIKUL et al., 2010).

Nos últimos anos o mercado de amidos vem crescendo e se aprimorando visando a comercialização de produtos com características específicas e que atendam às mais diversas exigências industriais. A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos (LEONEL et al., 1998; WURZBURG, 1986). Como, por exemplo, modificar as características de cozimento; diminuir a retrogradação e a tendência das pastas a formarem géis; aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e descongelamento, a transparência das pastas ou géis e a adesividade; melhorar a textura das pastas ou géis, formação de filmes; e adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (BEMILLER, 1997).

Composição e utilização do amido

O amido é a molécula mais comum em plantas que realizam armazenamento de energia (ZEEMAN et al., 2010). Quimicamente, caracteriza-se por dois tipos de polímeros de glicose, que são a amilose e a amilopectina (Figura 1). A amilose apresenta-se como uma cadeia predominantemente linear, composta por resíduos de glicose unidos por ligações α -1,4. Em contraste, a amilopectina é uma longa cadeia ramificada, constituída de centenas de cadeias de glicose α -1,4 unidas por ligações α -1,6 (HOOVER, 2001). A composição da maioria dos amidos contém cerca de 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina (MURPHY, 2000). A relação amilose/amilopectina levam a diferenças na estrutura granular, nas propriedades físico-químicas e nos produtos finais (VAN HUNG et al., 2006). As aplicações do amido de mandioca estão relacionadas ao estado físico do mesmo, geralmente associadas às proporções de amilopectina e amilose (RONGSIRIKUL et al., 2010). Os grânulos de amido são partículas semicristalinas que apresentam tamanho (0,1 a 200 μ m) e forma (redondo, oval, poliédrico) que variam com a origem botânica (BEMILLER & WHISTLER, 2009).

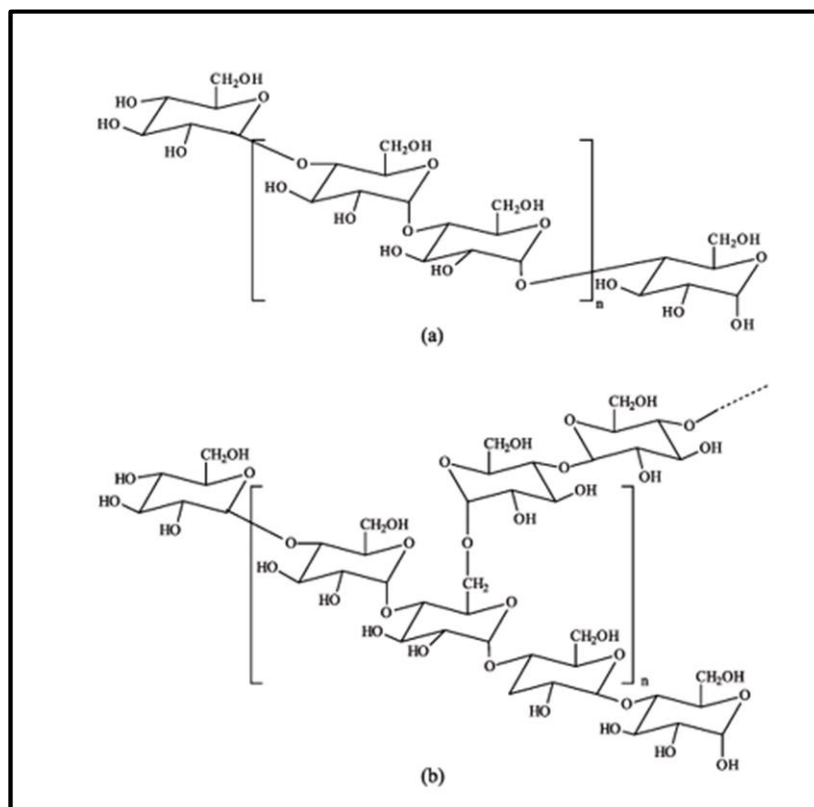


Figura 1. Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b). Fonte: Corradini et al. (2005).

O amido de mandioca oferece algumas vantagens em comparação a amidos derivados de outras fontes, como por exemplo, o amido de cereais. Suas propriedades físico-químicas diferenciadas, quando preparado em solução aquosa, resulta em pastas bastante claras e de elevada viscosidade (CHE et al., 2007), além de baixa temperatura de gelatinização e retrogradação, em comparação com amido de cereais (MUFUMBO et al., 2011). Ademais, o amido de mandioca é preferido pelas indústrias, na fabricação de alimentos processados e que precisam apresentar um sabor suave. Essa característica não é obtida, por exemplo, com o amido de milho, que confere o indesejável "sabor de cereais" aos alimentos (DEMIATE & KOTOVICZ, 2011).

A procura por amidos diferenciados de mandioca é tão importante que a descoberta do amido ceroso em mandioca tem aberto diversas oportunidades para exploração de novos produtos e mercados. Amido ceroso oferece vantagens comerciais, por possuírem propriedades funcionais que os tornam altamente adequados para determinados usos. A falta de amilose no amido significa que ele facilmente gelatiniza, produzindo pastas bastante claras com

viscosidades mais elevadas. Uma propriedade importante dos amidos cerosos a sua utilização em produtos alimentícios é a sua melhor estabilidade no congelamento e descongelamento em comparação com os amidos normais (SÁNCHEZ et al., 2010). A ausência de uma versão funcional da proteína GBSSI é que geralmente está associada à produção de mutantes cerosos (JAMES et al., 2003). O amido ceroso derivado de qualquer fonte é caracterizado pela alta estabilidade de descongelamento em comparação com o amido nativo. Assim, o amido ceroso apresenta-se como uma grande promessa para indústrias nas áreas de alimentos congelados, fabricação de adesivos e de papel (RHADIKA et al., 2014).

Biossíntese de amido

O amido é sintetizado e armazenado nos cloroplastos durante o dia como um produto transitório na folha, antes de ser degradado e resintetizado durante a noite para restabelecer o estoque orgânico do amiloplasto, como amido permanente (SAITHONG et al., 2013) (Figura 2). Em plantas vasculares, o amido é sintetizado dentro do amiloplasto por meio de uma via metabólica que contém quatro passos básicos: ativação do substrato (catalisada pela *ADP-glicose-pirofosforilase*), alongamento do polímero (síntese do amido), ramificação do polímero (enzimas ramificadoras) e de desramificação (enzimas desramificadoras) (RONGSIRIKUL et al., 2010). Em mandioca, alguns genes relacionados a biossíntese de amido foram estudados, incluindo *α -amylase* (Me-amy2) (TANGPHATSORNRUANG et al., 2005; BEYENE et al., 2013), *Sucrose transporter1* (Me-SUT1) (WORAWUT et al., 2002; CARPENTER et al., 2015), *ADP-glucose pyrophosphorylase* (AGPase), *Granule bound starch synthase I* (GBSSI) (AIEMNAKA et al., 2012; KHARABIAN-MASOULEH et al., 2012) *Granule bound starch synthase II* (GBSSII) e *Branching enzyme* (MUNYIKWA et al., 1997). Tal conhecimento fornece mais detalhes sobre o processo de biossíntese de amido em mandioca, e os seus principais componentes.

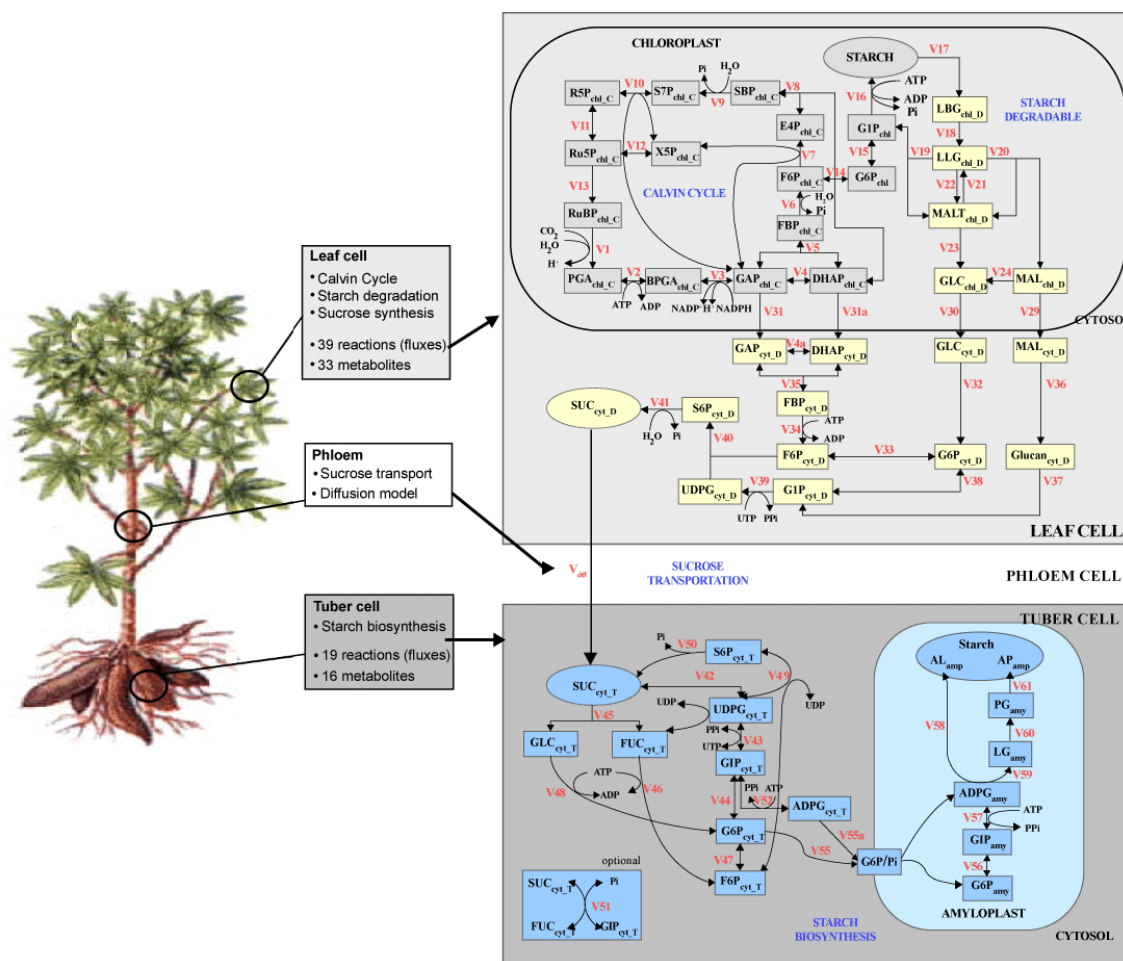


Figura 2. Resumo do modelo da biossíntese de amido. O esquema ilustra a concepção arquitetônica do modelo compartimentado para a biossíntese de amido, composta por 3 partes: folha, floema e tubérculos. Cada estrutura contém vias metabólicas específicas na produção de amido, que se encontra em alguns tipos celulares. Fonte: Saithong et al. (2012).

A enzima *Starch synthase* (SS) catalisa o alongamento das cadeias de glicose por meio da introdução de ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre os resíduos de glicose. Até o momento, várias SS foram identificadas em plantas superiores. Algumas *Granule-bound starch synthase* (GBSS tipos I e II) estão exclusivamente vinculados ao grânulo enquanto outras (SS I, II, e III) podem ser localizados parcialmente ou totalmente na fase solúvel (MYERS et al., 2000). O papel da GBSSI na rota metabólica do amido tem sido bem caracterizado em estudos de mutantes sem amilose (também denominado de amido ceroso ou *waxy*) (AIEMNAKA et al., 2012). Dependendo do produto final, algumas

indústrias requerem amido completamente desprovido de amilose, enquanto outros exigem alta quantidade de amilose. Contudo, frente à importância econômica e nutricional desta cultura, faz-se necessário estudos referentes aos genes envolvidos na síntese de amido, sua variação alélica e sua relação aos teores de amido encontrados em diferentes genótipos.

Variabilidade do grânulo de amido

A maioria dos grânulos de amido apresentam uma grande variação de tamanho de 1 a 110 μm , dependendo da fonte botânica, isso incluindo espécies de batata, batata doce, mandioca e inhame. A maior parte dos grânulos são ovais, embora alguns são redondos, esféricos, poligonais e de forma irregular também são encontrados. A maioria dos grânulos de amidos são simples, os que são de mandioca e inhame são exceção, pois parecem ser uma mistura de grânulos simples e compostos, ou seja, apresentam diferentes morfologias (HOOVER, 2001).

Os grânulos de amido em mandioca, têm morfologia arredondada, com uma superfície plana de um lado (truncado) e tamanho de 5 a 40 μm segundo Ceballos et al. (2007). Mweta et al. (2008), estudando os grânulos de amido de mandioca encontraram morfologia além do tipo arredondados, irregulares, ovais e truncados com tamanho médio de 10,14 μm . Em trabalhos realizados por Mtunguja et al. (2016), o tamanho dos grânulos variou de 12,5 a 13,8 μm . Já os trabalhos conduzidos por NUWAMANYA et al. (2010) variaram de 7,0-12,0 μm . Sendo assim, percebe-se que a variação de formas e tamanhos dos grânulos de amido de mandioca são bastante próximos nos diferentes estudos, quando utilizadas variedades comerciais.

Os diferentes atributos de amido de mandioca podem ser explorados para diferentes finalidades em indústrias de amido. A produção do bioetanol requer culturas com quantidades elevadas de amido e/ou de açúcar, que possa ser facilmente transformado em etanol pela fermentação (CEBALLOS et al., 2008).

Nos últimos anos, a busca por novas espécies ricas em reservas de amido tem despertado interesse para o desenvolvimento de avanços na tecnologia. No entanto, os dados disponíveis na literatura para mandioca não são suficientes,

e, a diversidade de grânulos disponível ainda necessita ser melhor avaliada em termos de composição, nutrição e potencial tecnológico.

Melhoramento molecular

A mandioca apresenta ampla diversidade genética decorrente da polinização cruzada da espécie e sua alta heterozigosidade. A deiscença abrupta dos frutos possibilita o surgimento de uma grande quantidade de novos genótipos de forma espontânea. No Brasil, essa variabilidade genética, se encontra mantida em bancos de germoplasma distribuídos em todo o país (FUKUDA; COSTA; SILVA, 2005). Em relação ao germoplasma de mandioca, destaque para Embrapa Mandioca e Fruticultura com mais de 1.500 acessos em campo e 300 *in vitro*, além de uma coleção de espécies silvestres com 600 acessos.

O melhoramento da mandioca tem atuado, sobretudo na avaliação de variedades locais, coleta e intercâmbio de germoplasma, recombinação e seleção de clones e uso de espécies silvestres para ampliar a base genética da cultura. Os avanços da biotecnologia têm facilitado e aumentado a eficiência dos trabalhos de melhoramento, possibilitando a seleção de variedades mais produtivas e/ou resistentes a pragas e doenças.

A caracterização com marcadores de DNA pode ser realizada em qualquer tecido e/ou estágio de desenvolvimento da planta com neutralidade fenotípica e, portanto possui grande potencial para auxiliar no processo de caracterização, seleção de genótipos e *fingerprint* molecular de variedades. Marcadores moleculares de DNA podem ser definidos como um segmento de DNA, relacionados ou não com um fenótipo e que representam diferenças em nível de genoma (polimorfismo). Podem ser classificados segundo a técnica utilizada (PCR ou hibridização) (AGARWAL et al., 2008).

Diversos marcadores tem sido utilizados na cultura da mandioca para o estudo da diversidade genética de germoplasma, como os microssatélites –SSR (*Simple Sequence Repeats*) (MONTERO-ROJAS, et al., 2011); RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (COLOMBO et al., 1998); TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) (CARMO et al., 2015); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (ELIAS et al., 2000) e os ISSR (*Inter-simple sequence*

repeat). Contudo, de modo geral, uma das limitações destes tipos de marcadores é o baixo nível de polimorfismo encontrado em indivíduos relacionados (KAWUKI et al., 2009). Em contrapartida, marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) representam a forma mais natural de variação genética (KRUGLYAK, 1997), sendo assim, tais marcadores podem discriminar polimorfismos em indivíduos altamente relacionados.

Avanços tecnológicos estão permitindo a automação de genotipagem em grande escala, especialmente para marcadores moleculares, como os SNPs (JENKINS & GIBSON 2002; BERNARDO & YU 2007), que prometem reduzir preços por conjunto de dados para o uso extensivo em várias culturas. Para a mandioca, SNPs são encontrados com uma frequência de um SNP para cada 62 pares de bases de sequências expressas (ESTs) (LOPEZ et al., 2005). Os SNPs tem sido utilizados em vários estudos para diferentes finalidades, como formação de *core collection* em mandioca (OLIVEIRA et al., 2014), avaliação das variações alélicas de genes relacionados com a via de biossíntese de carotenóides (WELSCH et al., 2010), biossíntese de glicoalcalóide (MANRIQUE-CARPINTERO et al., 2013) e também para avaliação da diversidade de nucleotídeos (JIMÉNEZ-GÓMEZ & MALOOF, 2009).

Além das possibilidades citadas acima, diversos trabalhos relacionados ao mapeamento associativo têm sido relatados, utilizando marcadores do tipo SNP. Como exemplo, Zanke et al. (2014) avaliaram o caráter altura da planta com uso de marcadores microssatélites e SNPs em um conjunto de variedades de trigo. Alguns destes marcadores foram associados a genes relacionados ao metabolismo e percepção de giberelina. Sukumaran et al. (2012) avaliaram 10 caracteres relacionados à qualidade de amido em sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Um SNP presente no gene *starch synthase II* (SSII) foi associado com a dureza do grão, enquanto o gene *starch synthase* (SSIIb) foi associado com o teor de amido.

Estudos desta natureza não têm sido feitos com genes relacionados à rota metabólica do amido em mandioca. Sendo assim, diante dos relatos de sucesso em outras espécies amiláceas, espera-se que o estudo das variações alélicas nos genes da rota metabólica do amido de mandioca, possam agregar informações sobre a diversidade genética presente na cultura, bem como contribuir para futuros estudos de mapeamento associativo visando estabelecer

a real associação das alterações alélicas com fenótipo, qualidade de grânulos de amido e também o rendimento de amido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v.27, p.617-631, 2008.

AIEMNAKA, P.; WONGKAEW, A.; CHANTHAWORN, J.; NAGASHIMA, S. K.; BOONMA, S.; AUTHAPUN, J.; PHUMICHA, C. Molecular characterization of a spontaneous waxy starch mutation in cassava. **Crop Science**, v. 52, p. 2121-2130, 2012.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v.86, p.2273-2282, 2009.

BEMILLER, J.; WHISTLER, R. **Starch Chemistry and Technology**. 3. ed. Burlington: Academic Press, 2009.

BEMILLER, J.N. Starch modification: challenges and prospects. **Starch/Stärke**, v. 49, p.31-127, 1997.

BERNARDO, R; YU, J. Prospects for genome-wide selection for quantitative traits in maize. **Crop Science**, v.47, p.1082–1090, 2007.

BEYENE, D.; MUKASA, S. B.; JANSSON, C.; DE VILLIERS, E. P.; FERGUSON, M.; RABBI, I. Y.; BAGUMA, Y. Patterns of nucleotide diversity in Meisa1 and G3pdh in wild and cultivated cassava. **SINET: Ethiopian Journal of Science**, v.36, p.65-72, 2013.

CARMO, C.D.; SANTOS, D.B.; ALVES, L.B.; OLIVEIRA, G.A.F.; OLIVEIRA, E.J. Development of TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) as New Tool

for Molecular Genetic Analysis in Cassava. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.33, p.1953-1966, 2015.

CARPENTER, M.A.; JOYCE, N.I.; GENET, R.A.; COOPER, R.D.; MURRAY S. R.; NOBLE, A.D.; TIMMERMAN-VAUGHAN, G.M. Starch phosphorylation in potato tubers is influenced by allelic variation in the genes encoding glucan water dikinase, starch branching enzymes I and II, and starch synthase III. **Frontiers in Plant Science**, v.6, Artículo 143, 2015.

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

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

CEBALLOS, H.; FAHRNEY, K.; HOWELER, R.; OSPINA, B. Cassava Potential for Bioethanol. In **Symposium-Biofuels in Developing Countries: Opportunities and Risks**, p. 625-628, 2008.

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

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

CHACÓN, J.; MADRIÑÁN, S.; DEBOUCK, D.; RODRIGUEZ, F.; TOHME, J. Phylogenetic patterns in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) inferred from

analyses of nuclear and chloroplast DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, p.260-267, 2008.

CHE, L.; LI, D.; WANG, L.; ÖZKAN, N.; CHEN, X. D.; MAO, Z. Effect of high-pressure homogenization on the structure of cassava starch. **International Journal of Food Properties**, v.10, p.911-922, 2007.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T. L.; CHARRIER, A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta Crantz*): I) RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.69-84, 1998.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; SILVA, M.J. da; SODRÉ, R.C.; MARTINS, M.L.L. *Manihot* In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17591>>. Acesso em: 07 Março 2016.

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

DEMIATE, I.M; KOTOVICZ, V. Cassava starch in the Brazilian food industry. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.31, p.388-397, 2011.

ELIAS, M.; PANAUD, O.; ROBERT, T. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta Crantz*) farming system, using AFLP markers. **Heredity**, v.85, p.219-230, 2000.

FAO, Cassava for food and energy security. FAO Newsroom. Disponível em:<<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2008/1000899/index.html>>. 2008. Acesso em: 21 de março de 2016.

FAO. Faostat database. Disponível em:<www.faostat.org>. 2014. Acesso em: 28 de abril de 2015.

FIALHO, J.F.; VIEIRA, E.A. Mandioca no Cerrado: orientações técnicas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 208, 2011.

FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; SILVA, S.D.O. **Manejo e Conservação de Recursos Genéticos de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Cruz das Almas, BA, 2005.

FUKUDA, W.M.G.; IGLESIAS, C. Recursos genéticos. In: SOUZA, L. da S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P. L. P. de; FUKUDA, W.M.G. (Ed.). **Aspectos Socioeconômicos e Agronômicos da Mandioca**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 301-323, 2006.

HERRERA-CAMPO, B. V.; HYMAN, G.; BELLOTI, A. Threats to cassava production: known and potential geographic distribution of four key biotic constraints. **Food Security**, v. 3, p.329-345, 2011.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.45, p.253-267, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Agrícola (2013)**. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 28 de abril de 2015.

JAMES, M.G.; DENYER K.; MYERS, A.M. Starch synthesis in the cereal endosperm. **Plant Biology**, v.6, p.215–222, 2003.

JENKINS, S.; GIBSON, N. High-throughput SNP genotyping. **Comparative and Functional Genomics**, v.3, p.57–66, 2002.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, J.M.; MALOOF, J.N. Sequence diversity in three tomato species: SNPs, markers, and molecular evolution. **BMC Plant Biology**, v.9, p.1, 2009.

KAWUKI, R.S.; FERGUSON, M.; LABUSCHAGNE, M.; HERSELMAN, L.; KIM, D.J. Identification, characterisation and application of single nucleotide polymorphisms for diversity assessment in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Molecular Breeding**, v.23, p.669-684, 2009.

KHARABIAN-MASOULEH, A.; WATERS, D. L.; REINKE, R. F.; WARD, R.; HENRY, R. J. SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. **Scientific Reports**, v. 2, Artigo 557, 2012.

KRUGLYAK, L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. **Nature Genetics**, v.17, p.21-24, 1997.

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M.P. Processamento industrial de fécula de mandioca e batata doce – um estudo de caso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 343-345, 1998.

LOPEZ, C.; PIEGU, B.; COOKE, R.; DELSENY, M.; TOHME, J.; VERDIER, V. Using cDNA and genomic sequences as tools to develop SNP strategies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.425–431, 2005.

MANRIQUE-CARPINTERO, N.C.; TOKUHISA, J.G.; GINZBERG, I.; HOLLIDAY, J.A.; VEILLEUX, R.E. Sequence diversity in coding regions of candidate genes in the glycoalkaloid biosynthetic pathway of wild potato species. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v.3, p.1467-1479, 2013.

MONTERO-ROJAS, M.; CORREA, A.M.; SIRITUNGA, D. Molecular differentiation and diversity of cassava (*Manihot esculenta*) taken from 162 locations across Puerto Rico and assessed with microsatellite markers. **AoB Plants**, v.2011, p.plr010, 2011.

MTUNGUJA, M.K.; THITISAKSAKUL, M.; MUZANILA, Y.C.; WANSUKSRI, R.; PIYACHOMKWAN, K.; LASWAI, H.S.; BECKLES, D.M. Assessing variation in physicochemical, structural, and functional properties of root starches from novel Tanzanian cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) landraces. **Starch-Stärke**, v.68, p.1-14, 2016.

MUFUMBO, R.; BAGUMA, Y.; KASHUB, S.; NUWAMANYA, E.; RUBAIHAYO, P.; MUKASA, S.; HAMAKER, B.; KYAMANYWA, S. Amylopectin molecular structure and functional properties of starch from three Ugandan cassava varieties. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v.3, p.195-202, 2011.

MUNYIKWA, T.R.I., LANGEVELD, S., SALEHUZZAMAN, S.N.I.M., JACOBSEN, E., VISSER, R.G.F. Cassava starch biosynthesis: new avenues for modifying starch quantity and quality. **Euphytica**, v.96, p.65–75, 1997.

MURPHY, P. **Starch**. In: Handbook of hydrocolloids. CRC press, INC. Boca Rotan, cap.3, p.41, 2000.

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

MYERS, A.M.; MORELL, M.K.; JAMES, M.G.; BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v.122, p.989-997, 2000.

NICK, C.; CARVALHO, S.P.; JESUS, A.M.S.; CUSTÓDIO, T.N.; MARIM, B.G.; ASSIS, L.H.B. Divergência genética entre subamostras de Mandioca. **Bragantia**, v.69, p.289-298, 2010.

NUWAMANYA, E.; BAGUMA, Y.; EMMAMBUX, N.; TAYLOR, J.; PATRICK, R. Physicochemical and functional characteristics of cassava starch in Ugandan

varieties and their progenies. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v.2, p.001-011, 2010.

OLIVEIRA, E.J.; FERREIRA, C.F.; SANTOS, V.S., OLIVEIRA, G.A. Development of a cassava core collection based on single nucleotide polymorphism markers. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.6472-6485, 2014.

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

OLSEN, K.M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n. 4, p. 517-526, Apr. 2004.

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

RADHIKA, N. K.; SHEELA, M. N.; DEVI, A. A.; SREEKUMAR; J.; KUMAR, T. M.; CHAKRABARTI, S. K. Genetic modification for designer starch from cassava. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 52, p.1-6, 2014.

RONGSIRIKUL, O.; SAITHONG, T.; KALAPANULAK, S.; MEECHAI, A.; CHEEVADHANARAK, S.; NETRPHAN, S.; SUKSANGPANOMRUNG, M. Reconstruction of Starch Biosynthesis Pathway. **Cassava Using Comparative Genomic Approach**, v.115, p.118-129, 2010.

SAITHONG, T.; MEECHAI, A.; CHEEVADHANARAK, S.; BHUMIRATANA, S. A Formal path inference of starch biosynthesis via mathematical modelling of metabolic changes in excess CO₂. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, v.5, p.024-037, 2012.

SAITHONG, T.; RONGSIRIKUL, O.; KALAPANULAK, S.; CHIEWCHANKASET, P.; SIRIWAT, W.; NETRPHAN, S.; CHEEVADHANARAK, S. Starch biosynthesis

in cassava: a genome-based pathway reconstruction and its exploitation in data integration. **BMC Systems Biology**, v.7, Artigo 75, 2013.

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

SCHMITZ, P. M., KAVALLARI, A. Crop plants versus energy plants- On the international food crisis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.4020-4021, 2009.

SOUZA, J.S.; OTSUBO, A.A. Perspectivas e potencialidades de mercados para os derivados de mandioca. In: OTSUBO, A.A.; MERCANTE, F. M.; MARTINS, C. de S. (Coord.). **Aspectos do Cultivo da Mandioca em Mato Grosso do Sul**. Dourados/Campo Grande: Embrapa Agropecuária Oeste/UNIDERP, p.13-30, 2002.

SUKUMARAN, S.; XIANG, W.; BEAN, S. R.; PEDERSEN, J. F.; KRESOVICH, S.; TUINSTRA, M. R.; YU, J. Association mapping for grain quality in a diverse sorghum collection. **The Plant Genome**, v.5, p.126-135, 2012.

TANGPHATSORNRUANG, S., NACONSIE, M., THAMMARONGTHAM, C., NARANGAJAVANA, J. Isolation and characterization of an [alpha]-amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Physiology and Biochemistry** v.43, p.821–827, 2005.

VAN HUNG, P.; MAEDA, T.; MORTA, N. Waxy and high-amylase wheat starches and flours: characteristics, functionality and application. **Trends in Food Science Technology**, v.17, p.448-456, 2006.

WELSCH, R.; ARANGO, J.; BÄR, C.; SALAZAR, B.; AL-BABILI, S.; BELTRÁN, J.; BEYER, P. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots

driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. **The Plant Cell**, v.22, p.3348-3356, 2010.

WORAWUT, Y.; SUKSANGPANOMRUNG, M.; LIMAPASENI, T. **Expression of cassava *Manihot exculenta* Crantz**. In: Sucrose transporter1 (MeSUT1) gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the protein. 33rd Congress on Science and Technology of Thailand, 2002.

WURZBURG, O.B. **Modified starches: properties and uses**. Boca Raton, CRC Press, p. 277, 1986.

ZANKE, C. D.; LING, J.; PLIESKE, J.; KOLLERS, S.; EBMEYER, E.; KORZUN, V.; RÖDER, M. S. Whole Genome Association Mapping of Plant Height in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). **PloS One**, v.9, p.e113287, 2014.

ZEEMAN, S. C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A. M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.209-234, 2010.

ARTIGO 1

POLIMORFISMO EM GENES DA ROTA METABÓLICA DO AMIDO DE MANDIOCA E ASSOCIAÇÃO COM TEOR DE MATÉRIA SECA NAS RAÍZES¹

¹Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico Genetics and Molecular Research.

Polimorfismo em genes da rota metabólica do amido de mandioca e associação com teor de matéria seca nas raízes

Resumo: A distribuição e frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem contribuir para o entendimento das variações associadas a características de interesse. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade nucleotídica em seis genes envolvidos na biossíntese de amido em mandioca utilizando um painel de 96 acessos. Os genes sequenciados e alinhados foram utilizados para obtenção das estimativas de diversidade de nucleotídeos (π), sítios segregantes (θ), teste D de Tajima e agrupamento *Neighbor Joining* (NJ). Em média foram identificados um SNP para cada 147 e 171 pares de bases nas regiões codificadoras e não-codificadoras, respectivamente, além de 13 loci heterozigóticos. Dos sete SNPs em regiões codificadoras, três estão relacionados a substituições não-sinônimas e quatro a substituições sinônimas. Entretanto, as associações entre os SNPs e o teor de matéria seca nas raízes não foram observadas. O parâmetro π variou de 0,0001 (*Granule bound starch synthase I*) a 0,0033 (*α -amylase*), com média de 0,0011, enquanto o parâmetro θ variou de 0,00014 (*Starch branching enzyme*) a 0,00584 (*Starch synthase I*), com média de 0,002353. Portanto, em média a diversidade θ foi o dobro de π . O teste D não sugeriu evidências de desvio da neutralidade nestes genes. Dos 96 acessos avaliados 82 foram agrupados pelo método NJ, com formação de cinco grupos, porém sem uma clara separação dos acessos quanto ao teor de matéria seca nas raízes, coloração da polpa das raízes, classificação quanto ao teor de compostos cianogênicos e sua forma de obtenção. A ampla variação observada nos genes da rota metabólica do amido pode ser utilizada na busca por associações com as propriedades funcionais do amido para uso dos polimorfismos para fins de seleção.

Palavras-chave: SNP, biossíntese, melhoramento, *Manihot esculenta* Crantz, marcador, matéria seca.

Polymorphism of starch pathway genes in cassava and association with the dry matter content in the roots

Abstract: The distribution and frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) can contribute to understand the changes associated to characteristics of interest. The aim of this study was to evaluate the nucleotide diversity in six genes involved in starch biosynthesis in cassava by using a panel of 96 accessions. The genes were sequenced and aligned and then used to obtain the nucleotide diversity estimative (π), segregating sites (θ), Tajima's D test and Neighbor Joining (NJ) clustering. On average, one SNP for each 147 and 171 base pairs was identified in coding and noncoding regions, respectively. Moreover, 13 heterozygous loci were found. Three out of seven SNPs in the coding region are related to non-synonymous replacement and four synonymous substitutions. However, the associations between the SNPs and the dry matter content in the roots were not observed. The parameter π ranged from 0.0001 (Granule bound starch synthase I) to 0.0033 (α -amylase), averaging 0.0011, while the parameter θ ranged from 0.00014 (Starch branching enzyme) to 0.00584 (Starch synthase I), averaging 0.002353. Therefore, on average θ diversity was twice the π . The θ diversity was typically twofold the π . D test did not suggest evidences of deviance of neutrality in these genes. Among the evaluated accessions, 82 out of 96 were clustered by NJ method, forming five groups, but without a clear separation of the accessions concerning the dry matter content in the roots, roots pulp coloration, classification of the cyanogenic compounds content and their obtaining processes. The large variation observed in the genes of the starch biosynthetic pathway can be used in the search for associations with the functional properties of starch for the use of polymorphisms for selection purposes.

Keywords: SNP, biosynthesis, breeding, *Manihot esculenta* Crantz, marker, dry matter.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie que produz raízes tuberosas, ricas em carboidratos e por isso é considerada fonte importante de energia para mais de 800 milhões de pessoas, principalmente nos trópicos (CEBALLOS et al., 2010; FAO, 2013). Apresenta elevado potencial adaptativo às mais diversas condições edafoclimáticas, principalmente em regiões com baixo índice pluviométrico e solos com baixa fertilidade natural (BURRELL, 2003; HERRERA-CAMPO et al., 2011), tornando seu cultivo essencial para as comunidades que vivem nestas regiões (NWOKORO et al., 2002; EL-SHARKAWY, 2004). Além do consumo *in natura* das raízes, os coprodutos da mandioca, a exemplo do amido, podem ser utilizados por diversos segmentos industriais.

O amido de mandioca oferece algumas vantagens na indústria de alimentos em comparação com amidos derivados de outras fontes, a exemplo do amido de cereais. Suas propriedades físico-químicas diferenciadas, quando preparado em solução aquosa, resultam em pastas bastante claras e de elevada viscosidade (CHE et al., 2007), além de baixa temperatura de gelatinização e menor retrogradação (MUFUMBO et al., 2011) em comparação com outras fontes de amido. Ademais, o amido de mandioca é preferido pelas indústrias, na fabricação de alimentos processados e que precisam ter um sabor suave.

Com a crescente demanda de amido, atrelado ao aumento significativo da população mundial, o desenvolvimento de cultivares de mandioca com melhor rendimento de amido por unidade de área, tem se tornado uma prioridade (SAITHONG et al., 2013). Por outro lado, o melhoramento genético de mandioca depende, dentre outros fatores, do entendimento da diversidade genética existente entre os acessos, sejam eles melhorados ou não, e dos possíveis mecanismos adaptativos e evolutivos envolvidos. A compreensão desta diversidade pode ser verificada pela comparação da análise de sequências de nucleotídeos, tanto de variedades melhoradas, quanto de seus progenitores selvagens. Estudos dessa natureza são escassos em mandioca, mas tem enorme potencial para contribuir no entendimento das relações gênicas envolvidas na biossíntese do amido (BEYENE et al., 2013).

As propriedades físico-químicas atreladas a qualidade e teor de amido em mandioca são correlacionadas com genes envolvidos nas distintas fases da biossíntese do amido e em diferentes fases do desenvolvimento das raízes (SAITHONG et al., 2013). A síntese de α -1,4-glucana consiste em três principais etapas nos cloroplastos e amiloplastos, relacionadas ao suprimento de glicose-6-fosfato (G6P) nos plastídios, síntese de ADP-glicose a partir da fosfato glucopiranosil (G1P) e síntese do amido a partir da ADP-glicose. As enzimas-chave na via biossintética do amido são ADP-glicose pirofosforilase (ADGP - *ADP-glucose pyrophosphorylase*) e as enzimas sintetizadoras de amido (SS - *starch synthases*). Na formação da molécula de amido, as enzimas SS adicionam unidades de glicose (G1P) no final não-reduzido das ligações α -1,4-glucana (SAITHONG et al., 2013). Existem pelo menos nove isoformas de SS que são responsáveis pela síntese de amilopectina. As enzimas ramificadoras também estão envolvidas na síntese de amilopectina. Por outro lado, as enzimas amido-sintases ligadas ao grão de amido (GSS - *granule bound starch synthase*) encontradas dentro dos grânulos são enzimas chave para a síntese de amilose (JOBBLING, 2004).

Diversos genes interagem e interferem na quantidade e composição dos grânulos de amido (LEE et al., 2009). Alterações na atividade das enzimas envolvidas nesta biossíntese podem desencadear a formação de grânulos de amido com características distintas. Tais alterações podem ocorrer naturalmente ou podem ser causadas de forma induzida por meio de mutações, buscando-se atender a interesses de mercado específico (FRANCO et al., 2001).

Estudos de diversidade genética em genes de vias bioquímicas importantes podem auxiliar na compreensão dos diferentes processos evolutivos dos quais as populações foram submetidas ao longo do tempo (BAYE et al., 2009), além de identificar a base genética da diversidade fenotípica dentro das espécies e compreender a origem da divergência fenotípica entre espécies (O'CONNOR & MUNDY, 2009). Várias abordagens têm sido aplicadas na associação de fenótipos de interesse econômico com polimorfismos de nucleotídeos de base única, comumente conhecidos como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Os marcadores SNPs tem sido utilizados em estudos de diversidade genética entre acessos de mandioca (LOPEZ et al., 2005; KAWUKI et al., 2009;

OLIVEIRA et al., 2014b) e no entendimento das variações alélicas de genes relacionados à biossíntese de carotenóides (WELSCH et al., 2010). Por outro lado, mesmo com o grande avanço das técnicas moleculares, ainda existe uma limitada compreensão sobre a evolução da base genética de características complexas e os genes envolvidos nas suas rotas metabólicas (FRASER et al., 2002). Identificar SNPs e compreender como sua variação modula a expressão de fenótipos pode resultar em avanços importantes no melhoramento genético da mandioca, impactando diretamente na segurança alimentar, na sustentabilidade e competitividade da cultura por permitir a exploração e uso de amidos diferenciados na indústria.

O objetivo deste estudo foi comparar o padrão de diversidade nucleotídica, usando técnicas que levam os processos evolutivos em seis genes candidatos envolvidos na rota metabólica do amido em mandioca: [*Starch branching enzyme* (Me-Be), *Granule bound starch synthase I* (Me-GBSSI), *Starch synthase I* (Me-SSI), *Sucrose transporter1* (Me-SUT1), α -*amylase* (Me-Amy2) e *Glucan Water Dikinase* (Me-GWD)], bem como proceder a associação dos SNPs com teor de matéria seca em acessos de mandioca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e extração de DNA

Foram utilizados 96 acessos de mandioca pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. O DNA total foi extraído utilizando-se o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), conforme descrito por Doyle e Doyle (1987). Com o intuito de avaliar a integridade do DNA e padronizar sua concentração, realizou-se quantificação em gel de agarose 1% por comparação visual com diversas concentrações do DNA fago λ (Lambda).

2.2 Desenho dos iniciadores

O desenho dos iniciadores foi realizado com auxílio do programa Primer 3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000), para seis genes envolvidos na rota metabólica do amido, devidamente caracterizados e depositados no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Tabela 1). Os critérios adotados na seleção dos iniciadores foram: i) temperatura de anelamento (TA)

variando de 55 a 60 °C; ii) diferença máxima de 3°C na TA entre os iniciadores de cada par; iii) conteúdo de GC variando de 40 a 60%.

Tabela 1. Relação de iniciadores para amplificação de genes envolvidos na rota metabólica do amido na mandioca.

| Primer | Sequência ID | Gene | Sequência primer ¹ | Ta ² (°C) | Fragmento (pb) |
|----------|--------------|--|---|----------------------|----------------|
| Me-Be | HM046986 | <i>Branching enzyme</i> | F: TGTGGAGTCGAAGCATGAA R: GCTGAGATTGCAAGACCTT | 60 | 336 |
| Me-GWD | JN618458 | <i>Glucan Water Dikinase</i> | F: TCCACACGACCAATCCATC R: ACCTTAGTCGTCCTTCCAA | 62 | 289 |
| Me-GBSSI | JF708949 | <i>Granule bound starch synthase I</i> | F: AGCTGAAGTTGGTCCCTGG R: CATAGCGGGGAGACACTGT | 60 | 197 |
| Me-SSI | EF667960 | <i>Starch synthase I</i> | F: TGAAGGCAGAGAGGAAGCT R: ATCACCAAAGCACCACGG | 64 | 537 |
| Me-SUTI | DQ138374 | <i>Sucrose Transporter 1</i> | F: TTGCTGTGTTTGTGGTCGG R: TCCCGTCTTCATCCTCATCG | 60 | 381 |
| Me-Amy2 | DQ017830 | <i>Alpha Amylase</i> | F: ATGTCTGGCTTCCTCCTCC R: GTTCCACCTTCAAAGATGCA | 61 | 354 |

¹- Iniciadores F: forward e R: reverse; ²-Ta, temperatura de anelamento.

2.3 Amplificação do DNA e sequenciamento das amostras

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo 10 ng de DNA genômico, 1x tampão (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 2,0 µmol/L de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2,0 µmol/L de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0,3 µmol/L de cada iniciador (Qiagen, Hilden, Germany) e água ultra-pura esterilizada (Merck Millipore, Watford, UK) para completar o volume final.

A amplificação foi realizada com um ciclo de 5 min a 94 °C; seguido por 30 ciclos de 40s a 94 °C; 60s de anelamento com temperaturas variando de 60 a 64 °C, dependendo do par de iniciadores; 60s de extensão a 72 °C; e uma

extensão final de 5 min a 72 °C em termociclador modelo Veriti® 96-well (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os produtos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,5%, a 100V, em tampão TAE 0,5X (Tris-Acetato EDTA) por aproximadamente quatro horas e, corados em solução de brometo de etídeo a 1,5 µl.100mL⁻¹. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no equipamento fotodocumentador Kodak Gel Logic-220 (Carestream Health, Rochester, USA). Os produtos de PCR foram purificados pelo kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Germany) e em seguida submetidos ao sequenciamento sanger no equipamento ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, USA).

2.4 Análise de dados de sequenciamento

Os dados de sequenciamento foram editados para obtenção de sequências de DNA com alta qualidade. Para isso, filtros de qualidade para a trimagem das bases foram utilizados, tendo como critério um Q-score ≥ 5 , e threshold de 50% para os picos heterozigóticos. As sequências de baixa qualidade foram eliminadas das análises. Em seguida, foram formados *contigs* e suas respectivas sequências consenso, a partir do alinhamento das sequências, utilizando o *software* SeqManPro (DNASTAR Inc. Madison, USA). A busca pelas mutações foi realizada na sequência consenso, observando-se concomitantemente possíveis SNPs e inspecionando-se também a qualidade dos picos dos eletroferogramas em todo o alinhamento.

Após a obtenção das sequências consenso foi realizado um BLASTn no banco de dados Phytozome v.11.0, na busca por sequências similares para cada gene e em seguida realizadas comparações com as regiões contendo íntrons e éxons, identificadas *in silico*. O número médio de diferenças nucleotídicas entre duas sequências amostradas de forma aleatória (diversidade de nucleotídeos - π) foi calculada de acordo com Nei (1987): $\pi = n / (n-1) \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$, em que n é o número de sequências analisadas, p_i e p_j são as frequências das sequências i e j , respectivamente, na amostra e π_{ij} é a proporção de diferenças nucleotídicas entre as sequências i e j . A diversidade θ de Watterson (1975) foi estimada pela fórmula $\theta = k / a_n$ em que k é o número de sítios segregantes (SNPs) nas

sequências e $a_n = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$. Também foi realizado o teste D de Tajima (TAJIMA, 1989) para avaliar a existência de desvio da neutralidade. Todas estas análises foram realizadas com auxílio do *software* Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013). Também foi realizada a predição das substituições de nucleotídeos a partir do códon de iniciação para verificar a ocorrência de modificação do aminoácido.

2.5 Análises filogenéticas

Foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências por meio do Clustal W e quando necessário foi realizada a edição manual do alinhamento dos genes sequenciados utilizando o *software* BioEdit (HALL, 1999). As relações genéticas entre os acessos foram calculadas utilizando uma matriz de distâncias, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980), em seguida foi realizado o agrupamento dos acessos para cada gene, com base no método *Neighbor Joining* (SAITOU & NEI, 1987). A consistência dos padrões de agrupamento foi avaliada pelo método *bootstrap* com 1000 repetições. As árvores filogenéticas foram editadas no *software* FigTree v.1.4.2. (RAMBAUT, 2014).

2.6. Associações entre o polimorfismo molecular e teor de matéria seca nas raízes

Os dados históricos de teor de matéria seca nas raízes foram obtidos pelo método da balança hidrostática, de acordo com Kawano et al. (1978). O teste Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para identificar possíveis associações entre os SNPs e o teor de matéria de seca nas raízes dos acessos de mandioca. Estas análises foram realizadas com auxílio do programa Action Stat (ESTATCAMP, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises das sequências e polimorfismos

O tamanho dos fragmentos dos genes analisados variou de 171 a 350 pares de bases (pb), sendo que diversos polimorfismos nos genes da rota metabólica do amido para os diferentes acessos de mandioca foram observados na análise destas sequências (Figura 1). No total, onze SNPs foram identificados nos seis fragmentos gênicos investigados, tanto em regiões intrônicas quanto

exônicas, porém não foram encontradas inserções/deleções (Tabela 2, Figura 1). Em média foram encontrados 1 SNP/147 pares de bases(pb) nas regiões codificadoras e 1 SNP/171 pb nas regiões não-codificadoras dos genes da rota metabólica do amido. De modo geral, os SNPs ocorrem na frequência de um a cada 100-500 pb, porém em mandioca foram relatadas frequências de 1 SNP/121 pb (KAWUKI et al., 2009), 1 SNP/509 pb (LOPEZ et al., 2005), 1 SNP/1072 pb (SAKURAI et al., 2013) e 1 SNP/350 pb (POOTAKHAM et al., 2014). Uma das principais razões para explicar esta grande diferença no número de SNPs por sequência de DNA é a natureza do material genético utilizado para comparação. Os resultados do presente trabalho se assemelham bastante aos obtidos por Kawuki et al. (2009), na qual foram utilizados 74 acessos de germoplasma para comparação dos polimorfismos em nível de DNA, o que reforça a hipótese de identificação de maior polimorfismo em função da origem do material genético, pois no presente trabalho 96 acessos foram utilizados para analisar os genes da rota metabólica do amido.

Além dos SNPs, foram identificados outros 13 loci heterozigóticos (Tabela 2, Figura 1), o que é perfeitamente esperado para uma espécie alógama com elevada sensibilidade a endogamia, que tende a favorecer o estado heterozigótico em diversos loci. Dos 26 SNPs identificados por Kawuki et al. (2009) na análise de nove genes de mandioca, apenas três loci não apresentaram genótipos heterozigóticos, o que reafirma a existência elevada de heterozigosidade, mesmo em regiões gênicas. Ainda considerando o número de loci heterozigóticos observou-se situação inversa em relação à distribuição dos SNPs, pois em média, foram identificados 1 locus heterozigótico a cada 172 e 98 pares de base em regiões codificadoras e não-codificadoras, respectivamente.

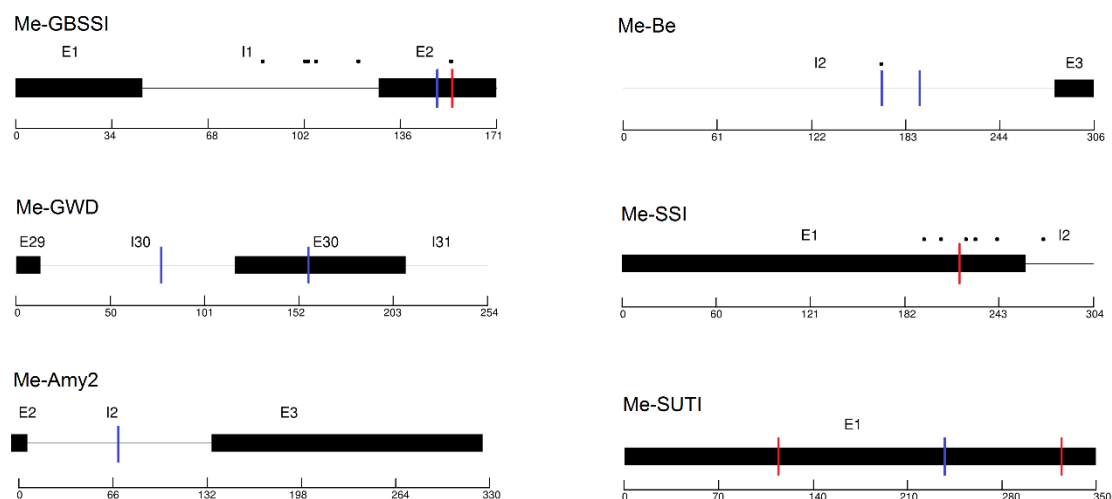


Figura 1. Mapeamento das regiões gênicas das sequências consenso de diferentes acessos de *Manihot esculenta* Crantz para os genes *Granule bound starch synthase I* (Me-GBSSI), *Glucan Water Dikinase* (GWD), α -*amylase* (Me-Amy2), *Starch branching enzyme* (Me-Be), *Starch synthase I* (Me-SSI) e *Sucrose transporter1* (Me-SUT1). Os retângulos representam os éxons e as linhas os íntrons. As barras azuis e vermelhas indicam transições (Ts) e transversões (Tv), respectivamente. Os pontos pretos representam os loci heterozigóticos.

Tabela 2. Distribuição dos marcadores SNPs e loci heterozigóticos em genes da rota metabólica do amido em 96 acessos de *Manihot esculenta* Crantz.

| Gene | Região exônica | | | Região intrônica | | |
|----------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|----|-----|
| | Nº SNP | LH ¹ | NN ² | Nº SNP | LH | NN |
| Me-Be | 0 | 0 | 26 | 2 | 1 | 280 |
| Me-GWD | 1 | 0 | 106 | 1 | 0 | 148 |
| Me-GBSSI | 2 | 1 | 87 | 0 | 5 | 84 |
| Me-SSI | 1 | 5 | 260 | 0 | 1 | 44 |
| Me-SUT1 | 3 | 0 | 350 | - | - | - |
| Me-Amy2 | 0 | 0 | 202 | 1 | 0 | 128 |

¹LH: número de loci heterozigóticos; ²NN: número de nucleotídeos da sequência de DNA.

Me-Be: *Starch branching enzyme*; Me-GWD: *Glucan Water Dikinase*; Me-GBSSI: *Granule bound starch synthase I*; Me-SSI: *Starch synthase I*; Me-SUT1: *Sucrose transporter1*; Me-Amy2: α -*amylase*.

Independente da região genômica, os genes Me-SSI e Me-GBSSI apresentaram o maior número de loci heterozigóticos. De modo geral, o

surgimento de loci heterozigóticos em mandioca deve-se ao sistema reprodutivo da espécie, quase que predominantemente por alogamia (NARINA et al., 2011), enquanto que a manutenção da heterozigosidade é preservada pela via propagação clonal, que garante a permanência deste estado ao longo dos diferentes ciclos de cultivo.

O gene *Me-Be* apresentou dois SNPs na forma de transição (Tabela 2 e 3) e um locus heterozigótico em região não-codificadora em 280 pares de bases avaliadas, ao contrário, não foram identificados SNP e loci heterozigóticos na região codificadora. O que condiz com as várias isoformas da enzima descritas na literatura (DINGES et al., 2003; LIN et al., 2013). O gene *Me-Be* tem como função básica a ramificação da molécula de amilopectina na rota metabólica do amido (KHARABIAN-MASOULEH et al., 2012). No entanto, ainda não é claro quais enzimas são responsáveis pela grande diversidade de estruturas da molécula de amilopectina. De acordo com Streb & Zeeman (2014), as enzimas de desramificação em *Arabidopsis* e arroz são bem conservadas entre estas espécies, com a função primordial de facilitar a cristalização da pré-amilopectina, sintetizada pelas amido sintases e enzimas ramificadoras, que também influenciam a estrutura final da amilopectina.

Tabela 3. Classificação do polimorfismo molecular das sequências consenso dos genes da rota metabólica do amido em diferentes acessos de *Manihot esculenta* Crantz.

| Gene ¹ | Transição | Transversão | Total Substituições | Total Nucleotídeos |
|-------------------|-----------|-------------|---------------------|--------------------|
| Me- Be | 2 | 0 | 2 | 306 |
| Me- <i>GWD</i> | 2 | 0 | 2 | 254 |
| Me- <i>GBSSI</i> | 1 | 1 | 2 | 171 |
| Me- <i>SSI</i> | 0 | 1 | 1 | 304 |
| Me- <i>SUT1</i> | 1 | 2 | 3 | 350 |
| Me- <i>Amy2</i> | 1 | 0 | 1 | 330 |

¹*Me-Be*: Starch branching enzyme; *Me-GWD*: Glucan Water Dikinase; *Me-GBSSI*: Granule bound starch synthase I; *Me-SSI*: Starch synthase I; *Me-SUT1*: Sucrose transporter1; *Me-Amy2*: α -amylase.

O gene *Me-GWD* apresentou dois SNPs do tipo transição entre os acessos de mandioca, sendo um em região exônica e outro em região intrônica com 106 e 148 bases analisadas, respectivamente (Figura 1, Tabelas 2 e 3). Estes resultados são condizentes com o trabalho de Carpenter et al. (2015) sobre a existência de polimorfismos no gene *GWD*, uma vez que foram identificados 32 SNPs em um fragmento de 690 pb no genoma da batata. Alguns estudos sugerem que a função da *Me-GWD* é ambígua em plantas, porém nas culturas do milho e cevada estes genes são responsáveis pela síntese de amido de armazenamento (MIKKELSEN et al., 2004).

Para o gene *GBSSI* foram identificadas dois SNPs, na forma de uma transição e uma transversão na região codificadora, além de seis loci heterozigóticos, sendo um na região codificadora e cinco na região não-codificadora (Tabelas 2 e 3). De fato, Aiemnaka et al. (2012) já haviam relatado a presença de três loci no gene *GBSSI* que conferem diferenças entre genótipos *waxy* e não-*waxy*, embora apenas um SNP tenha sido validado para distinguir estes fenótipos. Em outras culturas como o arroz (*Oriza sativa*), Kasem et al. (2012) relataram que as substituições não sinônimas em éxons do gene *GBSSI*, em espécies selvagens, podem levar a diferenças estruturais e resultar em alteração na atividade de *GBSSI* e nas características do amido. Dentre estas características a retrogradação, o teor de amilose e propriedades de viscosidade são as mais comumente relatadas (KHARABIAN-MASOULEH et al., 2012). *GBSSI* tem sido considerado responsável pela síntese de amilose em órgãos de armazenamento de plantas (JAMES et al., 2003) e sua expressão está associada à obtenção de amidos sem amilose (*waxy*), cujas propriedades funcionais específicas os tornam altamente adequadas para determinados usos industriais (ROLLAND-SABATÉ et al., 2012).

O gene *ME-SSI* apresentou um SNP do tipo transversão e cinco loci heterozigóticos na região exônica de 260 bases (Tabela 2). Carpenter et al. (2015) identificaram maior número de SNPs em batata (cinco SNPs em 315 bases) em um fragmento com tamanho semelhante ao desse estudo. Existem evidências de que isoformas deste gene desempenham papéis específicos na determinação da qualidade do amido, tais como distribuição do comprimento dos ramos em amilopectina (YANG et al., 2013). Um mutante de arroz com uma inserção no gene *SSI*, por exemplo, contém uma cadeia de amilopectina com

baixo grau de polimerização em comparação com o tipo selvagem (NAKAMURA, 2002).

Três SNPs (uma transição e duas transversões) foram identificadas na região codificadora de 350 pb do gene *Me-SUTI* (Tabelas 2 e 3). Relatos demonstram que o gene *SUTI* pode ser bastante polimórfico, a exemplo do estudo de Li et al. (2011) em *Brassica napus L.*, na qual foram detectados 142 SNPs (120 SNPs na região promotora 5'-UTR, 12 SNPs em éxons e 10 em introns). Este gene tem a função de transportar a sacarose sintetizada na folha através do floema para os tecidos de armazenamento para a síntese de três principais produtos (óleo, amido e proteína), por meio do metabolismo de carboidratos (LI et al., 2011). Estudos prévios sobre mutações no gene *SUTI* identificaram seu importante efeito na restrição do crescimento da planta e na germinação do grão de pólen (GOTTWALD et al., 2000; SIVITZ et al., 2008).

O gene *Me-Amy2* apresentou apenas uma transição na região intrônica (Tabelas 2 e 3). Outros estudos em mandioca identificaram elevado polimorfismo em sequências do gene da isoamilase1, sendo identificados 27 e 9 SNPs em variedades de mandioca cultivada e espécies selvagens, respectivamente, por meio da análise de um fragmento de 954 pb (BEYENE et al., 2013). As α -amilases (*Me-Amy2*) são enzimas responsáveis pela mobilização das reservas de carboidratos armazenados pela quebra da ligação α -1,4 das cadeias de glicose (FINCHER, 1989).

De modo geral, foi observado maior número de transições (sete) em comparação com a transversões (quatro). Este tipo de substituição é comumente relatada em polimorfismos moleculares, devido à estrutura bioquímica dos nucleotídeos e as propriedades químicas semelhantes de emparelhamento complementar das bases (GRIFFITHS et al., 2000). Observações semelhantes já foram relatadas em genes candidatos em mandioca (KAWUKI et al., 2009).

Embora os SNPs sejam mais prevalentes nas regiões não-codificadoras do genoma por serem consideradas regiões com pouca ou nenhuma pressão seletiva (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2006), os resultados do presente trabalho demonstraram maior prevalência de SNPs em regiões codificadoras (sete SNPs em 1031 bases em regiões codificadoras e quatro SNPs em 684 bases não-codificadoras – Tabela 2). Isso pode ser devido ao menor tamanho das sequências de DNA avaliadas, que deve ter contribuído para este viés.

Dos sete SNPs identificados em regiões codificadoras, para os diferentes genes, três estão relacionados a substituições não-sinônimas e quatro a substituições sinônimas (Tabela 4). A porcentagem de mutações não-sinônimas do presente trabalho (42,9%) é similar ao observado por Pootakham et al. (2014), ao identificarem SNPs via sequenciamento do transcriptoma de 16 genótipos de mandioca, indicando que embora as mutações não-sinônimas possam resultar em alteração na sequência das proteínas, e conseqüentemente na função do gene, estas mutações não tem causado distúrbios fisiológicos e genéticos que pudessem comprometer seriamente o desenvolvimento da cultura. Além disso, observou-se que nas mutações sinônimas, a maioria das substituições está presente na terceira base do códon (57,14%) (Tabela 4). Segundo Jimenez-Gomez & Maloof (2009) os SNPs tendem a se localizar na terceira posição do códon, reiterando a hipótese de que mutações deletérias ocorrem na primeira e segunda base, resultando, frequentemente, em substituições não-sinônimas, que são eliminadas ao longo do processo evolutivo.

Tabela 4. Tipos de substituição de nucleotídeos e classificação dos aminoácidos em genes da rota metabólica do amido em diferentes acessos de *Manihot esculenta* Crantz.

| Gene ¹ | Posição do SNP | Códon genético | Aminoácido ² | Tipo de Substituição ³ |
|-------------------|----------------|----------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Me-GBSSI | 150 | ATG/ACG | Met/Tre | NS |
| | 155 | GTG/CTG | Val/Leu | NS |
| Me-SSI | 218 | GCA/GCT | Ala/Ala | S |
| | 114 | GCC/GCA | Ala/Ala | S |
| Me-SUT1 | 237 | TCA/TCG | Ser/Ser | S |
| | 325 | GGT/CGT | Gli/Arg | NS |
| Me-GWD | 157 | TAT/TAC | Tir/Tir | S |

¹Me-Be: Starch branching enzyme; Me-GWD: Glucan Water Dikinase; Me-GBSSI: Granule bound starch synthase I; Me-SSI: Starch synthase I; Me-SUT1: Sucrose transporter1; Me-Amy2: α -amylase. ²Met: Metionina; Tre: Treonina; Val: Valina; Ala: Alanina; Ser: Serina; Gli: Glicina; Arg: Arginina; Tir: Tirosina. ³NS: Não sinônima; S: Sinônima.

As regiões exônicas dos genes *Me-SSI* e *Me-GWD* foram fortemente conservadas entre os acessos de mandioca, apresentando apenas substituições sinônimas, ao contrário do gene *GBSSI* que apresentou duas substituições não-sinônimas (Tabela 4). Dependendo do posicionamento na proteína, as substituições do gene *GBSSI* nos aminoácidos (*Met/Tre* e *Val/Leu*) podem modificar a propriedade funcional desta enzima e, conseqüentemente nas características fenotípicas do amido. Estudos prévios do gene *GBSSI* revelaram uma mutação (C/G) na posição 78/79 do éxon 11 que resulta na produção de fenótipos contrastantes quanto ao tipo de amido (ceroso ou não-ceroso) (AIEMNAKA et al., 2012). Em outras culturas como o sorgo, também foi relatado que uma mutação que altera o aminoácido 268 de ácido glutâmico (*Glu*) para histidina (*His*) resulta em sorgo não-ceroso (HAMBLIN et al., 2007). Foram encontradas em arroz outras modificações não-sinônimas de aminoácidos para o gene *GBSSI* que também podem ocasionar alterações das características do amido (KASEM et al., 2012). No presente estudo, as substituições não-sinônimas nos SNPs 150 e 155 não resultaram em mudança para o fenótipo ceroso de mandioca (Tabela 4).

A identificação de SNPs em genes relacionados a fenótipos de ampla importância comercial como é o caso do amido de mandioca, possui grande potencial para uso no melhoramento desta espécie, sobretudo como marcador genético para seleções indiretas. Por exemplo, estudos com o gene *Isoamylase1* revelaram que a substituição do aminoácido serina/leucina pode estar associada com modificações na qualidade de características de raiz em mandioca (BEYENE et al., 2010, 2013).

Para as associações entre os SNPs, o teor de matéria seca que variou de 27,9% a 41,9%, foi dividido em categorias: alto (>36,0%); médio (32,1%<MS<36,0%) e baixo teor (<32,0%). Considerando o nível de significância de 5%, não houve nenhuma associação entre o teor de matéria seca e o polimorfismo observado nos genes da rota metabólica do amido (Tabela 5). Por outro lado, o SNP na posição 155 do gene *Me-GBSSI* apresentou p-valor<0,06, indicando que dentre todos os genes avaliados, o *Me-GBSSI* é o que tendeu a apresentar alguma associação com esta importante característica na cultura da mandioca. De fato, ao avaliarem clones cerosos e não-cerosos de mandioca provenientes de oito diferentes progênies, Karlström et al. (2016) observaram

efeito significativo para teor de matéria seca ($p < 0,01$), em que os clones cerosos (mutantes para o gene *GBSSI*) apresentaram em média 0,8% menos matéria seca. A ausência de significância ($p < 0,05$) para teor de matéria seca, considerando os SNPs identificados no presente trabalho, pode ser devido ao fato de não se ter avaliado nenhum genótipo ceroso dentre os 96 acessos avaliados.

Tabela 5. Nível de significância de SNPs associados com matéria seca, em diferentes acessos de *Manihot esculenta* Crantz.

| Gene ¹ | Nome SNP | Posição do SNP (pb) | p-valor ² |
|-------------------|----------|---------------------|----------------------|
| Me- <i>GBSSI</i> | SNP1 | 150 | 0,42 ^{ns} |
| | SNP2 | 155 | 0,06 ^{ns} |
| Me- <i>Amy2</i> | SNP3 | 75 | 0,11 ^{ns} |
| | SNP4 | 168 | 0,51 ^{ns} |
| Me- <i>Be</i> | SNP5 | 193 | 0,75 ^{ns} |
| | SNP6 | 114 | 0,15 ^{ns} |
| Me- <i>SUT1</i> | SNP7 | 237 | 0,23 ^{ns} |
| | SNP8 | 325 | 0,84 ^{ns} |
| Me- <i>GWD</i> | SNP9 | 78 | 0,85 ^{ns} |
| | SNP10 | 157 | 0,62 ^{ns} |
| Me- <i>SSI</i> | SNP11 | 218 | 0,25 ^{ns} |

¹Me-*GBSSI*: Granule bound starch synthase I; Me-*Amy2*: α -amylase; Me-*Be*: Starch branching enzyme; Me-*SUT1*: Sucrose transporter1; Me-*GWD*: Glucan Water Dikinase; Me-*SSI*: Starch synthase I; ²ns: não significativo pelo teste t ($p < 0,05$).

De modo geral, o teor de matéria seca nas raízes de mandioca tende a apresentar herança do tipo quantitativa com ação de vários genes (OLIVEIRA et al., 2014a, 2015a), portanto, ao analisar um painel de acessos com alta diversidade genética, como os 96 acessos de mandioca utilizados no presente trabalho, realmente é pouco provável que SNPs específicos possam ser responsáveis por explicar as diferenças entre o teor de matéria seca nos acessos de mandioca. De fato, Karlström et al. (2016) mencionaram que embora a pequena diferença no teor de matéria seca entre clones de mandioca ceroso e não-ceroso (0,8%) tenha sido suficiente para detecção de diferenças estatísticas

entre as médias desta característica, ainda há um desconhecimento dos fatores genéticos envolvidos, sugerindo inclusive a presença de efeitos pleiotrópicos ou de genes ligados ao gene *GBSSI*. Portanto, é mais provável que as diferenças moleculares nos genes da rota metabólica do amido estejam relacionados mais diretamente com características de menor complexidade, a exemplo daquelas relacionadas às propriedades do amido sob condições de aquecimento e resfriamento. Assim, as variações moleculares observadas nos genes da rota metabólica do amido de mandioca descritos no presente trabalho serão futuramente validados para estudos associativos para as propriedades da pasta.

3.2 Diversidade de nucleotídeos

Os genes da rota metabólica do amido apresentaram diversidade nucleotídica (π) que variaram de 0,0001 (Me-*GBSSI*) a 0,0033 (Me-*Amy2*), com média de 0,0011, enquanto a diversidade θ de Watterson (1975) variou de 0,00014 (Me-*Be*) a 0,00584 (Me-*SSI*), com média de 0,002353 (Tabela 6). Portanto, em média a diversidade θ foi o dobro da diversidade π . Além da ampla variação entre estas estatísticas, a diferença entre os parâmetros θ e π foi de aproximadamente 40x e 28x, respectivamente entre os genes da rota metabólica do amido, indicando que alguns genes da rota metabólica do amido de mandioca sofreram maior taxa de mutação ao longo do processo evolutivo, ou que alguns genes desta via foram mais propensos a sofrerem os efeitos de seleção, a exemplo do Me-*Be*, Me-*GWD*, Me-*GBSSI* e Me-*SUTI*. Ao analisarem variedades de arroz contrastantes para os genes *Wx* e *OsC1*, que regulam o teor de amilose e a coloração dos apículos, Choudhury et al. (2014) observaram para o locus *Wx* (associado ao gene *GBSSI*), diversidade π elevada e bastante similar entre variedades do tipo glutinoso ($\pi = 0,0053$) e não glutinoso ($\pi = 0,0043$). Estes autores atribuíram esta não diferenciação clara entre os fenótipos glutinoso e não glutinoso em arroz à possibilidade de haver outros genes que influenciam a característica.

Tabela 5. Resumo do polimorfismo observado em genes da rota metabólica do amido, em diferentes acessos de *Manihot esculenta* Crantz considerando índices de diversidade.

| Gene ¹ | Nº sequências | θ^2 | π^2 | D^2 |
|-------------------|---------------|------------|---------|----------|
| Me-Be | 96 | 0,00014 | 0,00019 | -1,33738 |
| Me-GWD | 92 | 0,00186 | 0,00021 | -1,38928 |
| Me-GBSSI | 93 | 0,00165 | 0,00012 | -1,07898 |
| Me-SSI | 87 | 0,00584 | 0,00255 | -1,39486 |
| Me-SUTI | 87 | 0,00085 | 0,00019 | -0,91084 |
| Me-Amy2 | 49 | 0,00378 | 0,00334 | -0,27819 |

¹Me-Be: *Starch branching enzyme*; Me-GWD: *Glucan Water Dikinase*; Me-GBSSI: *Granule bound starch synthase I*; Me-SSI: *Starch synthase I*; Me-SUT1: *Sucrose transporter1*; Me-Amy2: α -amylase; ² θ : diversidade de nucleotídeos; π : diversidade média de nucleotídeos; D : teste D de Tajima.

O teste de neutralidade de Tajima (D) foi utilizado para avaliar se os dados de sequenciamento mostraram evidências de desvio da neutralidade. Os valores D observados foram todos negativos (variação de -0,278192 a -1,394866), e não significativos, demonstrando que todos os genes apresentaram variação neutra e que houve um equilíbrio entre os efeitos de deriva genética e mutação nestes acessos, sem grandes evidências de fortes intensidades de seleção. Por outro lado, o processo de domesticação das espécies tende a reduzir a diversidade de nucleotídeos em genes controladores de características específicas e úteis para o homem durante a domesticação, o que faz com que os genes associados a uma característica em particular sob seleção positiva durante as diferentes etapas de domesticação e melhoramento tendam a apresentar as chamadas “assinaturas de seleção” relacionadas a padrões típicos de baixa diversidade de nucleotídeos (CHOUDHURY et al., 2014). De fato, mesmo tendo avaliado apenas acessos da espécie cultivada (*M. esculenta*), a menor diversidade nucleotídica nos genes Me-Be, Me-GWD, Me-GBSSI e Me-SUTI pode representar indícios de maior efeito seletivo nestes genes ao longo do processo evolutivo. Por outro lado, Beyene et al. (2013) apresentaram uma descrição detalhada dos padrões comparativos de SNPs nos genes Isoamylase1 (*Meisa1*) e desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (*G3pdh*) em 10 acessos silvestres (*M.*

esculenta subsp. *flabellifolia*) e 12 acessos da espécie cultivada, e demonstraram o processo seletivo pode atuar de forma bastante variada entre espécies silvestres e cultivadas, uma vez que a diversidade nucleotídica no gene *Meisa1* foi maior na espécie cultivada, enquanto *G3pdh* na espécie silvestre.

3.3 Análise de agrupamento

O perfil do agrupamento formado com base na análise do polimorfismo dos genes da rota metabólica do amido de mandioca demonstrou a formação de cinco grupos (Figura 2), com 82 acessos agrupados e outros 14 acessos não agrupados por apresentam-se bastante divergentes em relação aos demais grupos. De modo geral não foi observada nenhuma relação entre o agrupamento formado com o teor de matéria seca nas raízes (Figura 3), de forma análoga ao que foi observado na análise individual dos efeitos dos SNPs para esta característica (Tabela 5). Embora os grupos G1, G2 e NG tenham apresentado menores valores em relação aos demais grupos, não houve diferença significativa entre estes grupos pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Além do teor de matéria seca nas raízes, utilizaram-se informações históricas dos acessos de mandioca quanto à coloração da polpa das raízes, classificação quanto ao teor de compostos cianogênicos e a origem do acesso (se variedade local ou melhorada). Contudo, também não foi possível observar nenhuma relação entre o agrupamento dos acessos formados pelo polimorfismo nos genes da rota metabólica do amido com os padrões de categorização mencionados acima (Tabela 6).

Em função da grande variação genética existente na cultura da mandioca, a classificação dos acessos com base em caracteres fenotípicos não tem sido uma tarefa muito fácil. Por exemplo, Oliveira et al. (2015b), analisaram 474 acessos de mandioca para as características produção de amido, teor de matéria seca da raiz, teor de amilose, e teor de compostos cianogênicos utilizando o algoritmo *affinity propagation*. Os autores identificaram nove grupos de diversidade, com elevada homogeneidade das distâncias genéticas entre os grupos, sobretudo para teor de matéria seca da raiz, teor de amilose. Além disso, também não foi possível proceder a classificação clara dos grupos com base no teor de compostos cianogênicos.

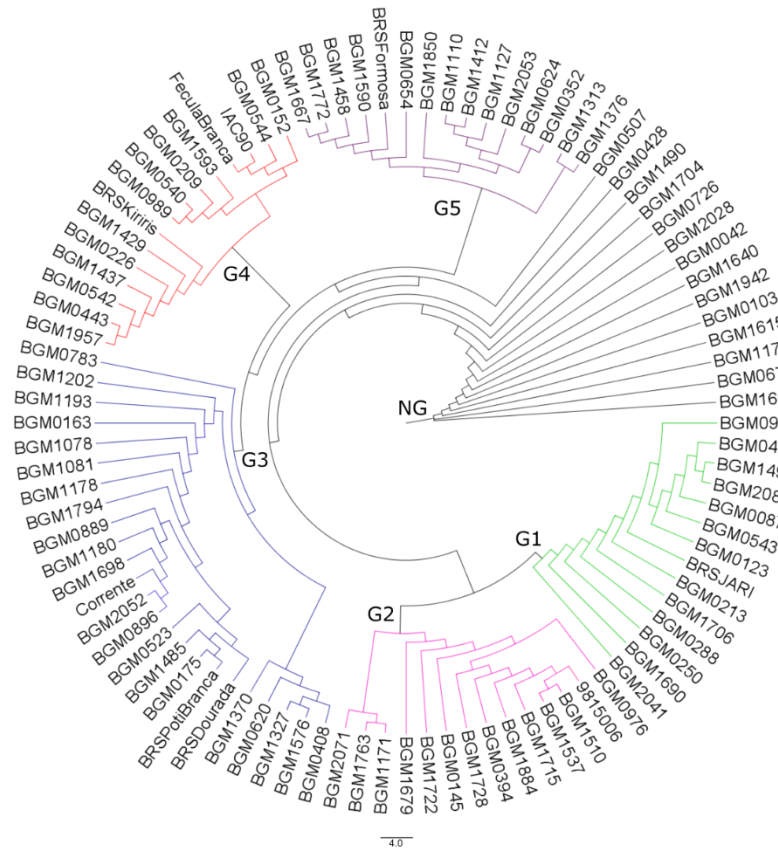


Figura 2. Agrupamento dos 96 acessos de mandioca com base no método *Neighbor Joining* e no polimorfismo em genes da rota metabólica do amido. Os grupos formados estão representados em diferentes cores.

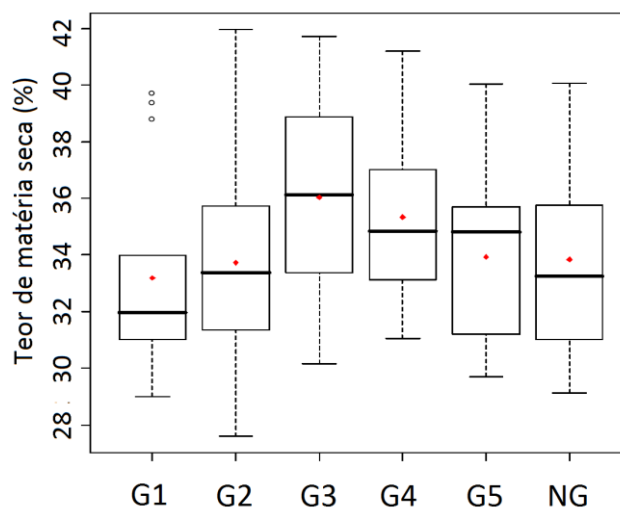


Figura 3. Boxplot do agrupamento formado pelos 96 acessos de mandioca com base no polimorfismo em genes da rota metabólica do amido e considerando a variação no teor de matéria seca nas raízes.

Tabela 6. Resumo do polimorfismo observado em genes da rota metabólica do amido, em diferentes acessos de *Manihot esculenta* Crantz considerando índices de diversidade.

| Grupos | Cor da Polpa ¹ | | | | Compostos cianogênicos ² | | | | Obtenção ³ | |
|--------|---------------------------|-----|-----|----|-------------------------------------|-----|-----|----|-----------------------|----|
| | AMA | BRA | CRE | SI | BR | MAN | INT | SI | VL | ME |
| G1 | 1 | 5 | 5 | 3 | 3 | 2 | 6 | 3 | 10 | 4 |
| G2 | - | 6 | 3 | 5 | 4 | - | 7 | 3 | 12 | 2 |
| G3 | 2 | 14 | 3 | 5 | 11 | 5 | 6 | 2 | 22 | 2 |
| G4 | - | 11 | 1 | 3 | 4 | - | 7 | 4 | 12 | 3 |
| G5 | - | 11 | 1 | 3 | - | 3 | 8 | 4 | 12 | 3 |
| NG | 2 | 7 | - | 5 | 8 | 1 | 2 | 3 | 12 | 2 |

¹AMA: amarela, BRA: branca, CRE: creme, SI: sem observação; ²BR: brava, MAN: mansa, INT: intermediária, ³VL: variedade local, ME: variedade melhorada.

Marcadores SNPs também tem sido utilizados para classificar acessos de mandioca em grupos de diversidade. Em trabalho recente, Oliveira et al. (2014b) utilizaram duas abordagens metodológicas complementares (análise discriminante de componentes principais e análise Bayesiana) para compreender a estrutura e diversidade genética de 1280 acessos de mandioca com 402 SNPs. Os autores observaram que ambas as metodologias apresentaram dificuldades e controvérsias em termos de alocação de alguns acessos a grupos específicos, e que informações prévias relacionadas à origem do acesso (se variedade local ou melhorada) e origens geográficas não foram suficientes para fornecer uma clara diferenciação entre os diferentes grupos. Portanto, depreende-se que a dificuldade de classificação dos acessos de mandioca com base nestes padrões deve ser feita por meio da integração de caracteres morfológicos, agronômicos e moleculares. Especificamente em nível molecular, a integração entre os diversos tipos de plataformas de genotipagem em nível gênico específico como genes de rotas metabólicas de maior interesse ou considerando todo o genoma devem ser priorizadas para uma melhor classificação e uso dos recursos genéticos de mandioca.

Um dos principais objetivos deste estudo foi comparar o padrão de diversidade nucleotídica em seis genes da rota metabólica do amido em mandioca e avaliar seu uso para estudos de diversidade. Portanto, os principais resultados demonstraram a existência de diversos polimorfismos moleculares

nos genes *Me-Be*, *Me-GBSSI*, *Me-SSI*, *Me-SUT1*, *Me-Amy2* e *Me-GWD* que podem ser utilizados e validados futuramente como marcadores genéticos, particularmente na análise da diversidade intra-gênica de acessos de *M. esculenta*. A frequência média de 1 SNP/147 pb nas regiões codificadoras e 1 SNP/171 pb nas regiões não-codificadoras destes genes demonstram o potencial de exploração destas mutações em comparação com marcadores tradicionalmente utilizados nas análises moleculares de mandioca.

REFERÊNCIAS

AIEMNAKA, P.; WONGKAEW, A.; CHANTHAWORN, J.; NAGASHIMA, S.K.; BOONMA, S.; AUTHAPUN, J.; SREEWONGCHAI, T. Molecular characterization of a spontaneous waxy starch mutation in cassava. **Crop Science**, v.52, p.2121-2130, 2012.

BAYE, T. M.; WILKE, R. A.; OLIVIER, M. Genomic and geographic distribution of private SNPs and pathways in human populations. **Personalized Medicine**, v.6, p. 623-641, 2009.

BEYENE, D.; BAGUMA, Y.; MUKASA, S. B.; SUN, C.; JANSSON, C. Characterisation and role of isoamylase1 (*MEISA1*) gene in cassava. **African Crop Science Journal**, v.18, p.1-8, 2010.

BEYENE, D.; MUKASA, S.B.; JANSSON, C.; VILLIERS; E P.,FERGUSON, M.; RABBI, I.Y.; BAGUMA, Y. Patterns of nucleotide diversity in *Meisa1* and *G3pdh* in wild and cultivated cassava. **SINET: Ethiopian Journal of Science**, v.36, p.65-72, 2013.

BURRELL M.M. Starch the need for improved quality or quantity and overview. **Journal of Experimental Botany**, v.218, p.4574–4762, 2003.

CARPENTER, M.A.; JOYCE, N.I.; GENET, R.A.; COOPER, R.D.; MURRAY S. R.; NOBLE, A.D.; TIMMERMAN-VAUGHAN, G.M. Starch phosphorylation in potato tubers is influenced by allelic variation in the genes encoding glucan water

dikinase, starch branching enzymes I and II, and starch synthase III. **Frontiers in Plant Science**, v.6, Artigo 143, 2015.

CEBALLOS, H., OKOGBENIN, E., PÉREZ, J. C., LÓPEZ-VALLE, L. A. B., DEBOUCK, D. Cassava. In: **Root and Tuber Crops**, p. 53-96, 2010.

CHE, L., LI, D., WANG, L., ÖZKAN, N., CHEN, X. D., MAO, Z. Effect of high-pressure homogenization on the structure of cassava starch. **International Journal of Food Properties**, v.10, p.911-922, 2007.

CHOUDHURY, B.I.; KHAN, M.L.; DAYANANDAN, S. Patterns of nucleotide diversity and phenotypes of two domestication related genes (*OsC1* and *Wx*) in indigenous rice varieties in Northeast India. **BMC genetics**, v.15, p.1-12, 2014.

DINGES, J.R.; COLLEONI, C.; JAMES, M.G.; MYERS, A.M. Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. **The Plant Cell**, v.15, p.666-680, 2003.

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

EI-SHARKAWY, M.A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v.4, p.481-501, 2004.

ESTATCAMP. Software Action. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. URL <http://www.portalaction.com.br/>. 2014. Acesso em: 17 de julho de 2016.

FAO. Faostat database. Disponível em:<www.faostat.org>. Acesso em: 28 de abril de 2015.

FINCHER, G. B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review of Plant Biology**, v.40, p.305-346, 1989.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades do Amido. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Propriedades Gerais do Amido**. Campinas: Fundação Cargill, v.1, 2001.

FRASER, H.B.; HIRSH, A.E.; STEINMETZ, L.M.; SCHARFE, C.; FELDMAN, M.W. Evolutionary rate in the protein interaction network. **Science**, v.296, p.750-752, 2002.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; ERSOZ E.; BROWN, G.R.; WHEELER, N.C.; NEALE, D.B. DNA sequence variation and selection of tag SNPs at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. **Genetics**, v.172, p.1915-1926, 2006.

GOTTWALD, J. R.; KRYSAN, P. J.; YOUNG, J. C.; EVERT, R. F.; SUSSMAN, M. R. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.13979-13984, 2000.

GRIFFITHS, A.J.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **An Introduction to Genetic Analysis**. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95–98, 1999.

HAMBLIN, M.T.; FERNANDEZ, M.G.S.; TUINSTRA, M.R.; ROONEY, W.L.; KRESOVICH, S. Sequence Variation at candidate loci in the starch metabolism pathway in sorghum: prospects for linkage disequilibrium mapping. **Crop Science**, v.47, p.125–134, 2007.

HERRERA-CAMPO, B. V.; HYMAN, G.; BELLOTI, A. Threats to cassava production: known and potential geographic distribution of four key biotic constraints. **Food Security**, v.3, p.329-345, 2011.

JAMES, M. G.; DENYER, K.; MYERS, A. M. Starch synthesis in the cereal endosperm. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.215-222, 2003.

JIMENEZ-GOMEZ, J.; MALOOF, J. Sequence diversity in three tomato species: SNPs, markers, and molecular evolution. **BMC Plant Biology**, v.9, Artigo 85, 2009.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.210-218, 2004.

KARLSTRÖM, A.; CALLE, F.; SALAZAR, S.; MORANTE, N.; DUFOUR, D.; CEBALLOS, H. Biological implications in cassava for the production of amylose-free starch: impact on root yield and related traits. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1-8, 2016.

KASEM, S.; WATERS, D. L.; HENRY, R. J. Analysis of starch gene diversity in the wild relatives of *Oryza sativa*. **Tropical Plant Biology**, v.5, p.286-308, 2012.

KAWUKI, R.S.; FERGUSON, M.; LABUSCHAGNE, M.; HERSELMAN, L.; KIM, D.J. Identification characterisation and application of single nucleotide polymorphisms for diversity assessment in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Molecular Breeding**, v.23, p.669–684, 2009.

KHARABIAN-MASOULEH, A.; WATERS, D. L.; REINKE, R. F.; WARD, R.; HENRY, R. J. SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. **Scientific Reports**, v. 2, Artigo 557, 2012.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980.

LEE, G.A.; KOH, H.J.; CHUNG, H.K.; DIXIT, A.; CHUNG, J.W.; MA, K.H.; LEE, S.Y.; LEE, J.R.; LEE, G. S.; GWAG, J.G.; KIM, T-S.; PARK, Y-J. Development of SNP-based CAPS and dCAPS markers in eight different genes involved in starch biosynthesis in rice. **Molecular Breeding**, v. 24, p. 93–101, 2009.

LI, F.; MA, C.; WANG, X.; GAO, C.; ZHANG, J.; WANG, Y.; CONG, N.; LI, X.; WEN, J.; YI, B.; SHEN, J.; TU, J.; FU, T. Characterization of sucrose transporter alleles and their association with seed yield-related traits in *Brassica napus* L. **BMC Plant Biology**, v.11, Artigo 168, 2011.

LIN, Q.; FACON, M.; PUTAUX, J.L.; DINGES, J.R.; WATTEBLED, F.; D'HULST, C.; MYERS, A. M. Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the *Zea mays* leaf. **New Phytologist**, v.200, p.1009-1021, 2013.

LOPEZ, C.; PIEGU, B.; COOKE, R.; DELSENY, M.; TOHME, J.; VERDIER, V. Using cDNA and genomic sequences as tools to develop SNP strategies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.425-431, 2005.

MIKKELSEN, R.; BAUNSGAARD, L.; BLENNOW, A. Functional characterization of α -glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. **Biochemical Journal**, v.377, p.525-532, 2004.

MUFUMBO R; BAGUMA Y.; KASHUB S.; NUWAMANYA E.; RUBAIHAYO P.; MUKASA S.; HAMAKER B.; KYAMANYWA S. Amylopectin molecular structure and functional properties of starch from three Ugandan cassava varieties. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v.3, p.195-202, 2011.

NAKAMURA, Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. **Plant Cell Physiology**, v.43, p.718-25, 2002.

NARINA, S.S.; JASTI, M.; BUYARAPU, R.; BHATTACHARJEE, R. In: Chittaranjan Kole (eds). Wild Crop Relatives: **Genomic and Breeding Resources**, p.133-155, 2011.

NEI, M. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York.

NWOKORO, S.O.; ORHERUATA, A.M.; ORDIAH, P.I. Replacement of maize with cassava sievates in cockerelstarter diets: effect on performance and carcass characteristics. **Tropical Animal Health and Production**, v. 34, p. 163-167, 2002.

O'CONNOR, T.D.; MUNDY, N.I. Genotype–phenotype associations: substitution models to detect evolutionary associations between phenotypic variables and genotypic evolutionary rate. **Bioinformatics**, v. 25, p94-100, 2009.

OLIVEIRA, E.J.; AIDAR, S.T.; MORGANTE, C.V.; CHAVES, A.R.M.; CRUZ, J.L.; COELHO FILHO, M.A. Genetic parameters for drought-tolerance in cassava. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, p.233-241, 2015a.

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

OLIVEIRA, E.J.; FERREIRA, C.F.; SANTOS, V.S.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; SILVA, M.S. Potential of SNP markers for the characterization of Brazilian cassava germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.127, p.1423-1440, 2014b.

OLIVEIRA, E.J.; SANTANA, F.A.; OLIVEIRA, L.A., SANTOS, V.S. Genotypic variation of traits related to quality of cassava roots using affinity propagation algorithm. **Scientia Agricola**, v.72, p.53-61, 2015b.

POOTAKHAM, W.; SHEARMAN, J. R.; RUANG-AREERATE, P.; SONTHIROD, C.; SANGSRAKRU, D.; JOMCHAI, N.; TANGPHATSORNRUANG, S. Large-scale SNP discovery through RNA sequencing and SNP genotyping by targeted enrichment sequencing in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **PloS One**, v.9, p.e116028, 2014.

RAMBAUT, A. **FigTree** v1.4.2, a graphical viewer of phylogenetic trees. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>> 2014. Acesso em: 28 de abril de 2015.

ROLLAND-SABATÉ, A.; SÁNCHEZ, T.; BULÉON, A.; COLONNA, P.; JAILLAIS, B.; CEBALLOS, H.; DUFOUR, D. Structural characterization of novel cassava starches with low and high-amylose contents in comparison with other commercial sources. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.161-174, 2012.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v.132, p.365–386, 2000.

SAITHONG, T.; RONGSIRIKUL, O.; KALAPANULAK, S.; CHIEWCHANKASET, P.; SIRIWAT, W.; NETRPHAN, S.; CHEEVADHANARAK, S. Starch biosynthesis in cassava: a genome-based pathway reconstruction and its exploitation in data integration. **BMC Systems Biology**, v.7, Artigo 75, 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406–25, 1987.

SAKURAI, T.; MOCHIDA, K; YOSHIDA, T; AKIYAMA, K; ISHITANI, M. Genome-Wide Discovery and Information Resource Development of DNA Polymorphisms in Cassava. **PloS One**, v.8, p.e74056, 2013.

SIVITZ, A.B.; REINDERS A.; WARD, J.M. *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. **Plant Physiology**, v.147, p.92-100, 2008.

STREB, S.; ZEEMAN, S.C. Replacement of the endogenous starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 of Arabidopsis with the rice orthologs reveals a degree of functional conservation during starch synthesis. **PloS One**, v.9, p.92174, 2014.

TAJIMA F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p.585-595, 1989.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725–2729, 2013.

WATTERSON, G.A. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theoretical Population Biology**, v.7, p.256–276, 1975.

WELSCH, R.; ARANGO, J.; BAR, C.; SALAZAR, B.; AL-BABILI, S.; BELTRÁNJ, CHAVARRIAGA, P.; CEBALLOS, H.; TOHME, J.; BEYER, P. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. **Plant Cell**, v.22, p.3348–3356, 2010.

YANG, Z.; WANG, Y.; XU, S.; XU, C.; YAN, C. Molecular evolution and functional divergence of soluble starch synthase genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Evolutionary Bioinformatics**, v.9, p.239-249, 2013.

ARTIGO 2

DIVERSIDADE FENOTÍPICA PARA CARACTERÍSTICAS DE AMIDO EM GERMOPLASMA DE MANDIOCA¹

¹Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico Acta Scientiarum Agronomy.

Diversidade fenotípica para características de amido em germoplasma de mandioca

Resumo: Demandas para o desenvolvimento de variedades de mandioca com amidos nativos diferenciais, tem orientado a busca por estas características no germoplasma de *Manihot esculenta* Crantz. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de acessos de mandioca para características de raízes e grânulos de amido, para orientar futuras aplicações industriais. Foram avaliados amidos de 56 acessos para número de grânulos em 1 g de amido (NGT); área (AG, em μm^2), comprimento (CG, em μm), largura (LG, em μm) e grau de arredondamento dos grânulos de amido (Round); teor de matéria seca nas raízes (MS, em %); cor da polpa (CP) e compostos cianogênicos (HCN). Imagens capturadas em microscópio óptico foram utilizadas para obtenção das médias fenotípicas, que em seguida foram analisadas pela análise de componentes principais (ACP), considerando os dados mistos (quantitativos e qualitativos). Diferenças significativas entre os acessos de mandioca para todas as variáveis mensuradas demonstram ampla variabilidade para características do grânulo de amido de mandioca. Correlações positivas e de elevada magnitude foram observadas entre AG x LG (0,98), AG x CG (0,98) e LG x CG (0,99), enquanto correlação negativa foi observada entre CP x MS (-0,43). Os grânulos de amido foram homogêneos e com predominância de formas circulares e truncadas. Os quatro primeiros componentes principais (PC) representaram 57,71% da variação total. As características AG, LG e CG, foram mais importantes no PC1, enquanto no PC2 foram as características Round, MS e CP. Foram identificados quatro grupos de diversidade com maior ajuste na classificação dos acessos com base na característica CP em comparação com HCN. Acessos com características diferenciais de amido foram identificados e sugestões de cruzamentos para geração de populações segregantes para obtenção de variedades de mesa e indústria foram propostos.

Palavras-chave: Melhoramento, *Manihot esculenta* Crantz, dados mistos, raiz.

Phenotypic diversity for starch traits in cassava germplasm

Abstract: The demands for the development of cassava varieties with differential native starches have guided the search for these characteristics in the germplasm of *Manihot esculenta* Crantz. Therefore, the objective of this study was to estimate the genetic diversity of cassava accessions for root and starch granules characteristics to guide future industrial applications. Starches from 56 accessions were evaluated for the number of granules in 1 g of starch (NTG); area (AG, μm^2), length (LG, in μm), width (WG, in μm), and starch granules roundness (Round); and also dry matter content in the roots (DMC, in %); pulp coloration (PulC) and cyanogenic compounds (HCN). Images captured by light microscopy were used to obtain the average phenotypic, and further analyzed by principal component analysis (PCA), considering the mixed data (quantitative and qualitative). Significant differences between the cassava accessions for all variables measured showed wide variability of cassava starch granule characteristics. High and positive correlations were observed between AG x WG (0.98), AG x LG (0.98), and WG x LG (0.99), while negative correlation was observed between PulC x DMC (-0.43). The starch granules were homogeneous and, predominantly, with circular and truncated shapes. The first four principal components (PC) accounted for 57.71% of total variation. The traits AG, LG and WG, were more important in the PC1, while Round, DMC, and PulC in PC2. Four diversity groups with better fitness for the classification of cassava accessions based on PulC characteristic were identified, in comparison with HCN. Accessions with differential starch characteristics were identified and suggestions of crossings for generation of segregating populations to obtain table and industry varieties have been proposed.

Key words: Improvement, *Manihot esculenta* Crantz, mixed data, root.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é considerada uma das culturas de maior importância no século XXI, devido à sua elevada adaptabilidade frente a condições adversas de clima e solo e, por requerer menor quantidade de insumos agrícolas para a sua produção em comparação com outras culturas (HOWELER et al., 2013). É amplamente utilizada para fins de subsistência humana e animal, além de aplicações industriais nos ramos alimentícios, energéticos e têxteis (HOWELER et al., 2013; FESSENDEN, 2014).

As raízes de mandioca são compostas basicamente por água (70%), amido (24%), fibra (2%), proteína (1%) e outras substâncias, incluindo minerais (3%) (TONUKARI, 2004). Portanto, a característica mais marcante na mandioca é a capacidade de acumulação de amido nas raízes, cujo teor varia de 70 a 90% da matéria seca (BAGUMA, 2004). Além disso, existe grande diversidade no teor, composição e propriedades físicas e químicas do amido de mandioca (NUWAMANYA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015a; SANOUSI et al., 2015), que resulta em diferentes aplicações industriais.

O amido é sintetizado nos amiloplastos das células vegetais, sendo formado por dois tipos de polímeros: amilopectina e amilose. A amilose apresenta-se como uma cadeia predominantemente linear, composta por resíduos de glicose unidos por ligações α -1,4. Em contraste, a amilopectina é uma longa cadeia ramificada, constituída de centenas de cadeias de glicose α -1,4 unidas por ligações α -1,6 (HOOVER, 2001). A maioria das variedades conhecidas de mandioca possuem amidos com cerca de 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina (MURPHY, 2000). A organização das moléculas de glicose no amido, o comprimento da cadeia de glicose, a relação amilose/amilopectina, apresentam grande influência na morfologia e no tamanho dos grânulos de amido (TESTER et al., 2004; COPELAND et al., 2009).

De modo geral, os grânulos de amido de mandioca são arredondados, formato oval ou truncado (circular, com uma superfície plana em uma de suas faces) e tamanho variando de 5 a 40 μ m (CEBALLOS et al., 2007). Segundo Lindeboom et al. (2004) o tamanho dos grânulos de amido pode ser agrupado em quatro classes: grande - acima de 25 μ m, médio de 10 a 25 μ m, pequeno de 5 a 10 μ m, e muito pequeno, inferior a 5 μ m.

Em comparação com cereais, o amido de mandioca apresenta propriedades particulares, que conferem maior resistência a tratamentos ácidos, composição de pastas únicas, que o torna adequado para produção de papel, têxteis, adoçantes, álcool e glutamato monossódico (MKUMBIRA et al., 2003; TAYLOR et al., 2012). A complexidade da biossíntese do amido resulta em ampla variabilidade natural na relação amilose/amilopectina, que se reflete na diversidade da morfologia dos grânulos (tamanho e forma), que é associada com diversas propriedades funcionais na indústria alimentícia (WANI et al., 2012). Além disso, a diversidade de variedades de mandioca utilizadas para extração de amido permite a obtenção de uma variabilidade de amidos, cujas partículas podem variar quanto à distribuição, tamanho, morfologia e propriedades físico-químicas. A distribuição e tamanho dos grânulos podem resultar em aglomerações distintas e influenciar no comportamento do amido sob certas condições de processamento e, conseqüentemente afetar a qualidade do produto final (MOLENDIA et al., 2006).

Além da relação amilose/amilopectina, peso molecular e estrutura do grânulo, alguns relatos demonstram que o tamanho dos grânulos pode afetar a composição, gelatinização, propriedades de pasta, susceptibilidade enzimática, cristalinidade, inchamento e a solubilidade do amido (WANI et al., 2012). Todas estas características parecem ser afetadas por condições ambientais e agrônômicas de cultivo, bem como por fatores genéticos, que resultam em alterações substanciais nas propriedades funcionais do amido (LAWAL et al., 2011). Embora, bastante estudado em relação às propriedades de pasta e composição química e física, poucos tem sido os estudos relacionados à diversidade genética para distribuição, forma e tamanho dos grânulos de amido de mandioca. O conhecimento da diversidade genética presente em bancos de germoplasma é fundamental para uso das variações fenotípicas no desenvolvimento de novas variedades que possam trazer propriedades funcionais em diferentes aplicações industriais (UPADHYAYA et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi caracterizar e avaliar a diversidade genética de acessos de mandioca para características associadas aos grânulos de amido, que podem contribuir para futuras aplicações industriais, e conseqüentemente maior uso dos recursos genéticos de *M. esculenta*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram utilizados 56 acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas-Bahia). A região apresenta clima tropical quente e úmido, Aw a Am, segundo a classificação de Köppen, com temperaturas médias anuais de 24,5° C, umidade relativa de 80% e precipitação média anual de 1.200 mm, solo classificado como latossolo amarelo distrófico. A escolha destes acessos foi realizada com base nos valores contrastantes para teor de amido, compostos cianogênicos e coloração da polpa.

Tabela 1. Acessos de mandioca utilizados na caracterização do amido.

| Genótipo | Origem | Obtenção | Cor da Polpa | Classificação HCN |
|----------|----------------------------|-----------------|--------------|-------------------|
| 9815006 | Cruz das Almas (BA) | Melhoramento | Branca | Mansa |
| BGM0250 | Ilha dos Frades (BA) | Variedade Local | Creme | Mansa |
| BGM0394 | Magé (RJ) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM0507 | Não informado (MT) | Variedade Local | Amarela | Mansa |
| BGM0540 | União dos Palmares (AL) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM0620 | Pentecoste (CE) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM0670 | São Joao Da Barra (RJ) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM0889 | Tocantinópolis (TO) | Variedade Local | Creme | Inter |
| BGM0982 | Não informado (AM) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM0989 | Manaus (AM) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1078 | Sape (PB) | Variedade Local | Amarela | Brava |
| BGM1081 | Goiana (PE) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1110 | Araranguá (SC) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1127 | Conceição do Coite (BA) | Variedade Local | Creme | Inter |
| BGM1171 | Bragança (PA) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1174 | Não informado | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1178 | Não informado | Variedade Local | Amarela | Inter |
| BGM1180 | Não informado | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1202 | Cruz das Almas (BA) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1313 | São Jose do Belmonte (PE) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1327 | Monteiro (PB) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1370 | Juazeirinho (PB) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1376 | São Vicente do Seridó (PB) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1412 | Cruzeta (RN) | Variedade Local | Branca | Inter |

Tabela 1. Cont...

| Genótipo | Origem | Obtenção | Cor da Polpa | Classificação HCN |
|-----------------|------------------------------|-----------------|--------------|-------------------|
| BGM1429 | Caruaru (PE) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1437 | Altinho (PE) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1458 | Macapá (AP) | Variedade Local | Branca | Inter |
| BGM1495 | Itiúba (BA) | Variedade Local | Branca | Inter |
| BGM1537 | Paratinga (BA) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1576 | São João do Piauí (PI) | Variedade Local | Branca | Inter |
| BGM1590 | Nazaré do Piauí (PI) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1615 | BR 407 (PI) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1640 | BR 135 (BA) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1667 | BR 316 (PA) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1690 | Araripina (PE) | Variedade Local | Creme | Mansa |
| BGM1698 | BR 163 (MS) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1704 | BR 230 (AM) | Variedade Local | Amarela | Brava |
| BGM1706 | BR 230 (AM) | Variedade Local | Creme | Mansa |
| BGM1715 | BR 177 (AM) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1722 | Santo Antônio Jesus (BA) | Variedade Local | Creme | Mansa |
| BGM1728 | Cruz das Almas (BA) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1772 | Chapadinha (MA) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1850 | Belém (BR 316) (PA) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| BGM1942 | Faro (PA) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM1957 | Juruti (AM) | Variedade Local | Creme | Brava |
| BGM2028 | Araripina (PE) | Variedade Local | Branca | Brava |
| BGM2041 | Cruz das Almas (BA) | Melhoramento | Creme | Mansa |
| BGM2052 | Pelotas (RS) | Variedade Local | Branca | Inter |
| BRS Dourada | São Felipe (BA) | Melhoramento | Creme | Mansa |
| BRS Formosa | Não informado (BA) | Melhoramento | Branca | Mansa |
| BRS Jari | Cruz das Almas (BA) | Melhoramento | Amarela | Inter |
| BRS Kiriris | Cruz das Almas (BA) | Melhoramento | Branca | Mansa |
| BRS Poti Branca | Cruz das Almas (BA) | Melhoramento | Branca | Inter |
| Corrente | Laje (BA) | Variedade Local | Branca | Brava |
| Fécua Branca | Marechal Cândido Rondon (PR) | Variedade Local | Branca | Mansa |
| IAC90 | Marechal Cândido Rondon (PR) | Melhoramento | Branca | Mansa |

2.2. Extração de amido das raízes

As raízes selecionadas foram lavadas em água corrente, e em seguida a polpa foi seccionada até completar 1kg para o processo de extração. As partes selecionadas foram trituradas em liquidificador com hélice não cortante (para diminuir o cisalhamento dos grãos de amido e, conseqüente modificação física) durante 90 segundos na proporção 1:1 (raiz/água fria). Este processo foi repetido após uma pausa de um minuto.

O material triturado foi filtrado em tecido tipo “voal” e em peneira para análise granulométrica (220 Mesh) acoplada em balde plástico (volume 5 litros). Em seguida foi realizada a lavagem da massa triturada com 3,5 litros de água fria. O filtrado foi acondicionado em câmara fria a 5°C durante 12 horas para decantação do amido. Após esse período, foi descartado o sobrenadante e o amido decantado no fundo do pote foi lavado com 20 ml de álcool 95% para acelerar a secagem do amido. O álcool foi descartado, o amido transferido para outros recipientes e acondicionados em estufa com circulação de ar forçada a 45°C até a secagem completa. O amido seco foi então macerado, com o auxílio de gral e pistilo, até a obtenção de um pó de textura fina. Em seguida, acondicionado em sacos plásticos e selados em seladora à vácuo, para análises posteriores.

2.3. Análise morfológica dos grânulos de amido e características das raízes

Para a visualização dos grânulos de amido, foi realizado uma solução de 1g de amido e 4g de água para simular a concentração do amido presente nas raízes de mandioca. Posteriormente, misturou-se 0,8 ml desta solução com 1,8 ml de solução de iodo 2% (2 g de iodeto de potássio-KI; 0,2 g de iodo- I₂ e 50 ml de água destilada). Um volume de 0,2 ml foi transferido para câmara de Neubauer para observação em microscópio óptico LEICA (DM500, Alemanha), aumento de 400 vezes. As imagens digitais foram capturadas com o auxílio do software LAS EZ, onde os quadrantes da extremidade da câmara e do centro foram registrados. Em seguida foi realizado o processamento e análise das imagens com auxílio do *software* ImageJ (SCHNEIDER, 2012) para a determinação das características: número dos grânulos em 1 grama de amido (NGT); área dos grânulos (AG, em μm^2); comprimento dos grânulos (CG, em μm); largura dos grânulos (LG, em μm); grau de arredondamento dos grânulos (Round);

O teor de cianeto foi mensurado pelo método qualitativo com uso do ácido pícrico, de acordo com Onwuka (2005). Para a determinação do teor do ácido cianídrico (HCN), três raízes de diferentes plantas de uma mesma parcela foram utilizadas. As raízes foram seccionadas na parte distal, mediana e proximal, e cerca de uma grama destas partes foram colocadas em tubos de ensaio. Em seguida adicionou-se cinco gotas de tolueno sobre a porção de raiz contido no tubo. Na tampa do tubo foram afixadas tiras do papel, impregnadas com a solução de picrato alcalino (carbonato de sódio 2,5% e ácido pícrico 0.5%). Um tubo foi utilizado como

controle, onde foram adicionados as soluções, porém sem amostras de raízes. Os tubos foram deixados a temperatura ambiente por 12 horas e, posteriormente, a quantificação dos teores de HCN foi realizada com auxílio de escala de cores e notas (variando de 1 a 9 – Figura 1).

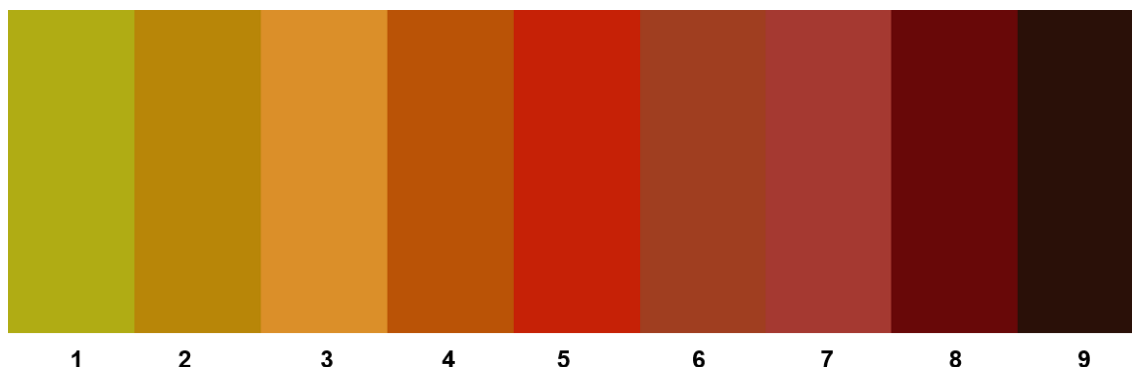


Figura 1. Escala de notas para avaliação do teor de ácido cianídrico (HCN).

A caracterização da coloração da polpa das raízes foi realizada por meio de análise visual descrita por Fukuda e Guevara (1998), cuja escala varia de branca, creme, amarela e rosada. Por outro lado, o teor de matéria seca nas raízes foi obtido pelo método da balança hidrostática de acordo com Kawano et al. (1978), em %.

2.4. Análise dos dados

Para análise granulométrica utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso com três repetições por acesso, totalizando quinze imagens por acesso. Inicialmente, os dados foram submetidos à análise de variância para averiguação de variabilidade genética entre os acessos. Em seguida as médias fenotípicas das variáveis quantitativas NGT, AG, CG, LG, Round e MS, foram padronizadas utilizando a função `scale` do R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

A análise de componentes principais (ACP), considerando os dados quantitativos e qualitativos (cor da polpa da raiz e classificação quanto ao teor de compostos cianogênicos) conjuntamente foi realizada utilizando o pacote `PCAmixdata` (CHAVENT et al., 2014) implementado no R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015). Neste caso os principais algoritmos são `PCAmix` (análise de

uma mistura de variáveis numéricas e categóricas), PCArot (rotação em PCAmix) e MFAmix (análise fatorial múltipla com dados mistos dentro do conjunto de dados).

Os quatro primeiros eixos da ACP foram utilizados para definição do número de agrupamentos pela distância Euclidiana, com uso do pacote NbClust (CHARRAD et al., 2014) do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015). O número de agrupamentos foi determinado pela análise gráfica da estatística de Hubert e índice D, que é baseado no ganho na inércia de agrupamento intra-cluster.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise das características quantitativas

O teste F foi significativo ($p < 0,001$) confirmando haver diferenças significativas entre as médias dos acessos de mandioca para todas as características quantitativas relacionadas ao grânulo de amido (Tabela 2). Portanto, torna-se necessário agrupar os acessos de mandioca para identificar grupos divergentes para maximização dos ganhos genéticos ao se utilizar este germoplasma para desenvolvimento de novas variedades. Em outras espécies a variação no tamanho e na forma dos grânulos de amido também tem sido associados ao germoplasma analisado, além de condições climáticas e práticas agrícolas adotadas pelos agricultores (SINGH et al., 2012; WANI et al., 2012). Em mandioca, Kanagarasu et al. (2014), também relataram significante variabilidade morfológica e para qualidade de raízes em 52 variedades locais da Índia.

O coeficiente de variação experimental (CV) que indica a magnitude da precisão experimental foi baixo ($< 10\%$) para todas as características, exceto para NGT. Este parâmetro demonstra a ótima precisão experimental obtida, para continuidade das inferências sobre as diferenças fenotípicas importantes entre os diferentes acessos de mandioca.

Tabela 2. Resumo da análise de variância, média e amplitude dos valores das características do teor e grânulo de amido mensuradas em acessos de germoplasma de mandioca.

| Característica ¹ | QM ² | CV ³ | Mínimo | Máximo | Média |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|--------|--------|--------|
| AG | 14,07*** | 7,91 | 81,00 | 178,58 | 113,37 |
| LG | 11,11*** | 4,55 | 9,24 | 14,03 | 10,96 |
| CG | 11,10*** | 4,57 | 9,25 | 14,01 | 10,99 |
| Round | 10,75*** | 0,81 | 0,85 | 0,91 | 0,88 |
| NGT | 15,42*** | 12,1 | 7,10 | 45,69 | 27,13 |
| MS | 10,80*** | 4,85 | 28,01 | 39,70 | 33,94 |

¹AG: área dos grânulos; LG: largura dos grânulos; CG: comprimento dos grânulos; Round: grau de arredondamento dos grânulos; NGT: número de grânulos em 1 grama de amido; MS: teor de matéria seca nas raízes. ²QM: quadrado médio do tratamento, *** Teste F altamente significativo; ³CV: coeficiente de variação experimental.

Correlações positivas e de elevada magnitude foram observadas entre as características AG x LG (0,98), AG x CG (0,98) e entre LG x CG (0,99) (Figura 1). Isto indica que a avaliação de apenas uma destas características pode refletir a variação das demais na mesma direção e intensidade. Por outro lado, correlação negativa de moderada magnitude foi observada entre as características CorPolpa x MS (-0,43), indicando que acessos com coloração mais amarelada (relacionado ao teor de carotenoides totais nas raízes de mandioca) tende a apresentar menor teor de matéria seca nas raízes. Esta correlação negativa é extremamente indesejável nos programas de melhoramento, uma vez que variedades de mandioca com maior teor de carotenoides esperam-se possuir maior MS, em função da preferência dos agricultores e indústrias.

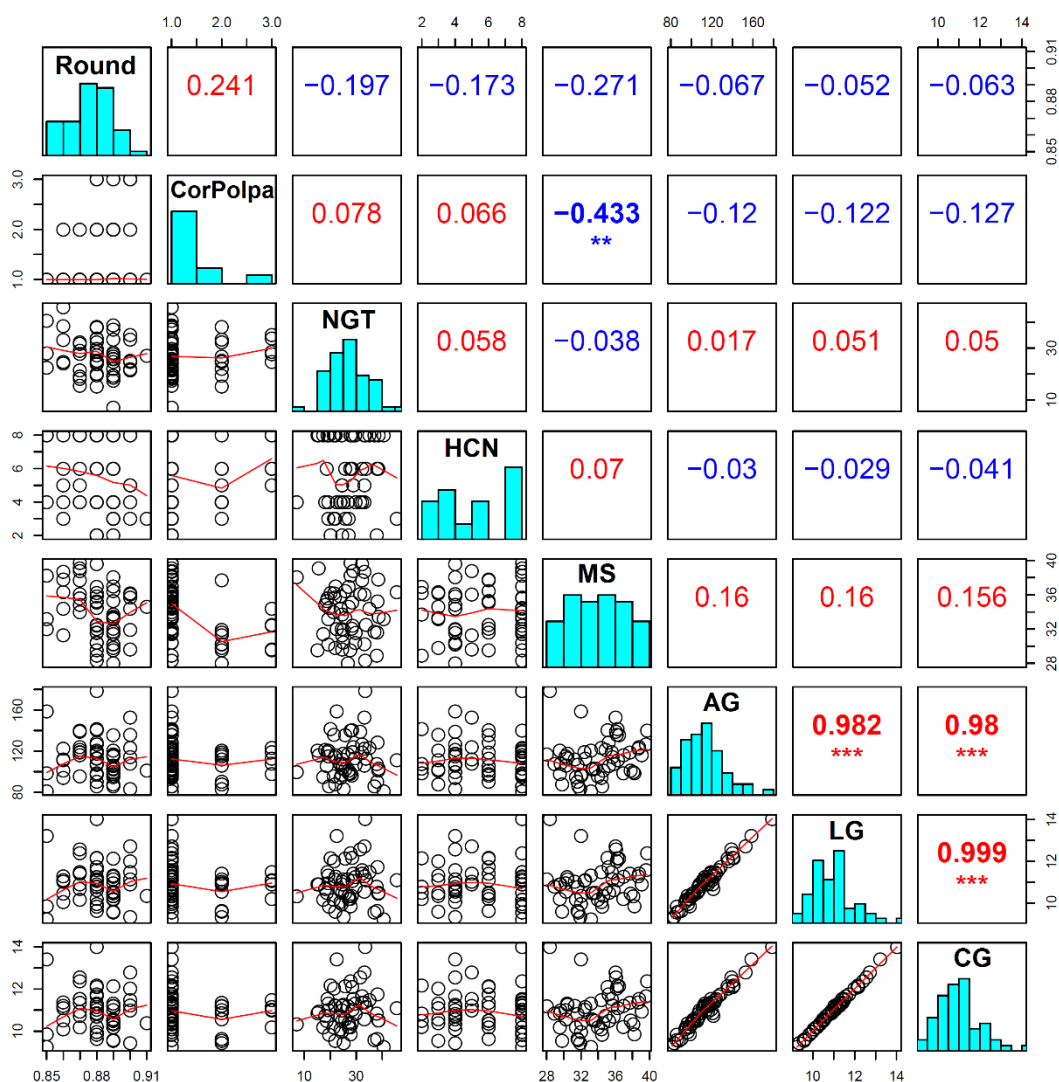


Figura 1. Correlação de Pearson entre variáveis relacionadas ao grânulo de amido e características da raiz, com base na análise de 56 acessos de mandioca. AG: área dos grânulos; LG: largura dos grânulos; CG: comprimento dos grânulos; Round: grau de arredondamento dos grânulos; NGT: número de grânulos em 1 grama de amido; MS: teor de matéria seca nas raízes; HCN: classificação da raiz de mandioca com base no teor de compostos cianogênicos; CorPolpa: coloração da polpa das raízes, ** e *** $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Observações desta natureza tem sido comumente reportadas pelos programas de melhoramento genético da África, cuja correlação negativa entre teor de carotenoides total e DMC variou de -0,22 a -0,29 (AKINWALE et al., 2010; ESUMA et al., 2012; NJOKU et al., 2015). Njoku et al. (2015) indicaram a necessidade de identificação de novas fontes de germoplasma africano ou latino

de coloração amarela e posterior introdução na tentativa de gerar populações segregantes para quebrar possíveis ligações genéticas entre estas características.

3.2. Análise dos grânulos por microscopia óptica

A análise microscópica das lâminas demonstrou homogeneidade na forma dos grânulos de amido entre os genótipos de mandioca, predominando formas circulares e truncadas (Figura 2). Embora formas ovais tenham sido relatadas em mandioca (MWETA et al., 2008), não foram observados grânulos com este formato no presente trabalho. A morfologia dos grânulos de amido pode variar entre espécies, mas de modo geral estas formas são ovaladas, elipsóides, esféricas, angulares e lenticulares (HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003). Cereais tais como o trigo, cevada e centeio possuem basicamente a forma lenticular e de tamanho grande e esférica com tamanho pequeno (TESTER et al., 2004; VAMADEVAN & BERTOFT, 2015).

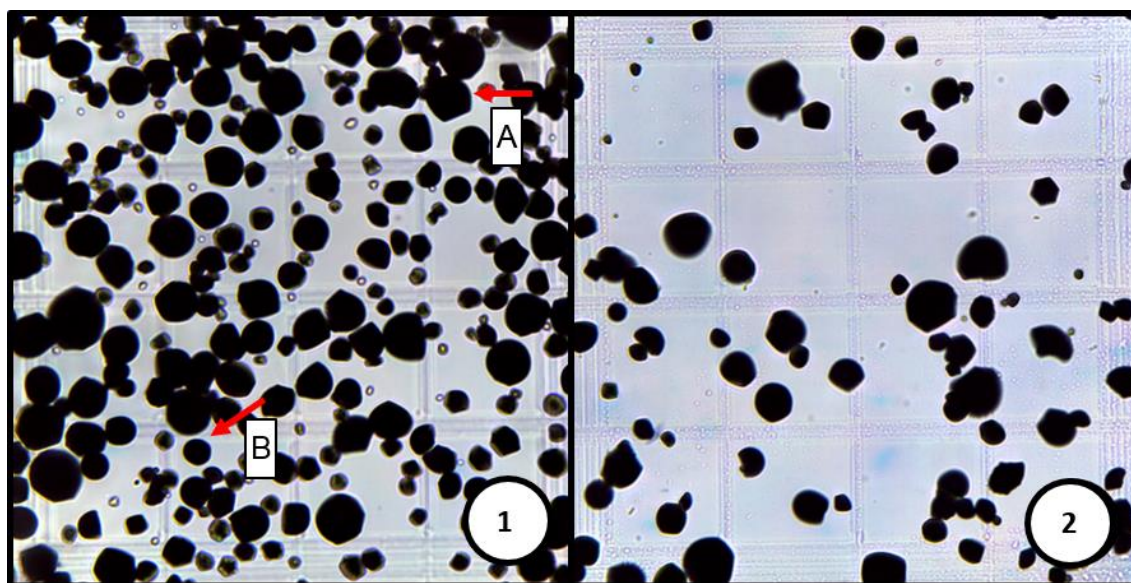


Figura 2. Microscopia óptica dos grânulos de amido de mandioca, aumento de 400 vezes. 1 - Acesso BGM1537; 2 - Acesso BGM1772. Setas indicam as formas truncada (A) e circular (B).

Embora a morfologia dos grânulos de amido tenha se mostrado bastante semelhante entre os genótipos de mandioca avaliados, diferenças significativas quanto ao número, tamanho, grau de arredondamento dos grânulos foram identificadas (Tabela 2). O comprimento e largura dos grânulos de amido

apresentaram amplitude muito próximas (entre 9,24 a 14,03 μm), com média de 10,96 e 10,99 μm , para largura e comprimento do grânulo, respectivamente. Isto resultou em um grau de arredondamento dos grânulos de amido próximo de 1 (variação entre 0,85 a 0,91, e média de 0,88). Além disso, o comprimento e largura dos grânulos de amido refletem na determinação da sua área, cuja variação foi de 81,00 a 178,58 μm^2 , com média de 113,37 μm^2 . O tamanho dos grânulos pode variar com o estágio de desenvolvimento da planta e o processo de tuberização da raiz, a partir do câmbio central (LEONEL, 2007). Entretanto, os valores obtidos no presente trabalho estão dentro do observado por outros autores, com variação observada entre 10,0 a 17,0 μm (CHARLES et al., 2005; MWETA et al., 2008; WICKRAMASINGHE et al., 2009; NUWAMANYA et al., 2010; ROLLAND-SABATÉ et al., 2012; MTUNGUJA et al., 2016). Por outro lado, Rolland-Sabaté et al. (2012) demonstraram que genótipos de mandioca com amido ceroso tendem a ter grânulos de amido de maior tamanho (entre 20 e 40 μm). Um aspecto interessante em relação ao tamanho dos grânulos de amido refere-se ao fato de que diversas propriedades físico-químicas, tais como o teor de amilose pela percentagem de transmitância de luz, poder de inchamento, e capacidade de ligação de água são significativamente correlacionadas com o tamanho médio do grânulo de amido em diferentes espécies vegetais (ZHOU et al., 1998).

Observações do número de grânulos em 1 grama de amido também demonstraram ampla variação (7,10 a 45,69 x 10⁶) com média de 27,13 x 10⁶. Uma observação importante nestas mensurações é que alguns grânulos de amido foram danificados durante o processo de extração, e com isso excluídos para não incorrer em erros nas análises. Observações desta natureza também foram relatados por Alcázar-Alay et al. (2015).

O teor de matéria seca nas raízes também foi bastante variável entre os acessos estudados (28,01 a 39,70%), com média de 33,94% (Tabela 2). Relatos de literatura tem demonstrado que o teor de matéria seca é bastante variável (16 a 53%), dependendo das condições ambientais de cultivo e dos genótipos avaliados (KIZITO et al., 2007; KAWUKI et al., 2011; EZUMA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015a).

3.3. Análise de componentes principais com dados mistos

A ACP foi utilizada para agrupar e reduzir a redundância entre as características avaliadas para qualidade do grânulo de amido e de outros atributos da raiz de mandioca. Os quatro primeiros componentes principais (PC) representaram a maior parte da variabilidade observada (57,71%) no germoplasma de mandioca para características relacionadas aos grânulos de amido (Tabela 3). O PC1 foi responsável por 24,2% da variação fenotípica na coleção de germoplasma de mandioca, na qual as características quantitativas AG, LG e CG foram as mais importantes para explicar a variação neste componente principal. O PC2 representou 12,87% da variação total, cujas características quantitativas Round e MS, e qualitativa (cor da polpa da raiz) foram as mais importantes para determinação desta variação. Por outro lado, o PC3 explicou 11,12% da variação, basicamente em função da variação da característica quantitativa (NGT) e qualitativa (HCN). O PC4 foi responsável por 9,52% da variação tendo como variáveis mais importantes o Round e a característica qualitativa (HCN). Os demais componentes principais apresentaram menor poder discriminatório dos acessos de mandioca e por isso não foram considerados nas análises posteriores.

Características macromoleculares (cristalinidade, tamanhos de grânulos, e propriedades térmicas) de clones de mandioca cerosa e normal, bem como amido ceroso de batata e milho foram utilizados para classificação dos acessos com propriedades específicas com base na ACP (ROLLAND-SABATÉ et al., 2012). Estes autores observaram que: a) os dois componentes principais explicaram 55 e 27% da variação total dos dados, respectivamente, b) o teor de amilose, o comprimento de absorção máxima de onda (λ_{\max}) e a densidade aparente de partícula (dGappw) foram agrupadas próximas, c) houve forte correlação entre o teor de amilose e λ_{\max} , d) o teor de amilose e dGappw representam características independentes associadas ao PC1. Portanto, características associadas aos grânulos de amido tendem a revelar uma importante organização na diversidade global de amido.

Tabela 3. Contribuição absoluta das características quantitativas e qualitativas (soma das contribuições absolutas dos níveis da variável qualitativa), com seus autovalores e contribuição para a variação total para os quatro primeiros componentes principais da análise de componentes principais com dados mistos.

| Características | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Classificação quanto ao HCN | 0,05 | 0,25 | 0,61 | 0,57 |
| Cor da polpa | 0,11 | 0,56 | 0,36 | 0,22 |
| Área do grânulo | 0,97 | 0,15 | -0,07 | -0,01 |
| Largura do grânulo | 0,98 | 0,15 | -0,04 | 0,01 |
| Comprimento do grânulo | 0,98 | 0,15 | -0,05 | -0,01 |
| Grau de arredondamento | -0,15 | 0,57 | -0,12 | 0,61 |
| Nº de grânulos em 1 g de amido | 0,07 | -0,02 | 0,66 | -0,24 |
| Teor de matéria seca | 0,31 | -0,68 | 0,05 | 0,11 |
| Autovalor | 3,15 | 1,67 | 1,45 | 1,24 |
| Proporção da variação (%) | 24,20 | 12,87 | 11,12 | 9,52 |

Dos 23 critérios utilizados para formação de agrupamentos do pacote NbClust (CHARRAD et al., 2014), oito (35%) indicaram a formação de quatro grupos, com base na análise dos quatro componentes principais. Portanto, o agrupamento dos acessos de mandioca com base nas características da raiz e do grânulo de amido foram realizadas com base nos critérios de Hartigan, TraceW, Rubin, Cindex, Silhouette, Ratkowsky, PtBiserial e SDindex, implementados no pacote NbClust.

O Grupo 1 foi formado por 11 acessos sendo um clone melhorado (98150-06) e 10 variedades locais (BGM1171, BGM1942, BGM1412, BGM1495, BGM1576, BGM1429, BGM1376, BGM1772, BGM1590 e BGM1715). Este grupo possui como principal característica os maiores valores médios para AG, CG, LG e MS (Figura 3 e 4). O Grupo 2 foi formado por três genótipos melhorados (BGM2041, BRS Dourada e BRS Formosa) e 11 variedades locais (BGM1957, BGM0889, BGM1127, BGM1313, BGM1537, BGM1698, BGM1850, Fécula Branca, BGM1706, BGM1690, BGM1722 e BGM0250). Como características mais marcantes deste grupo tem-se menor MS e NGT (Figura 3).

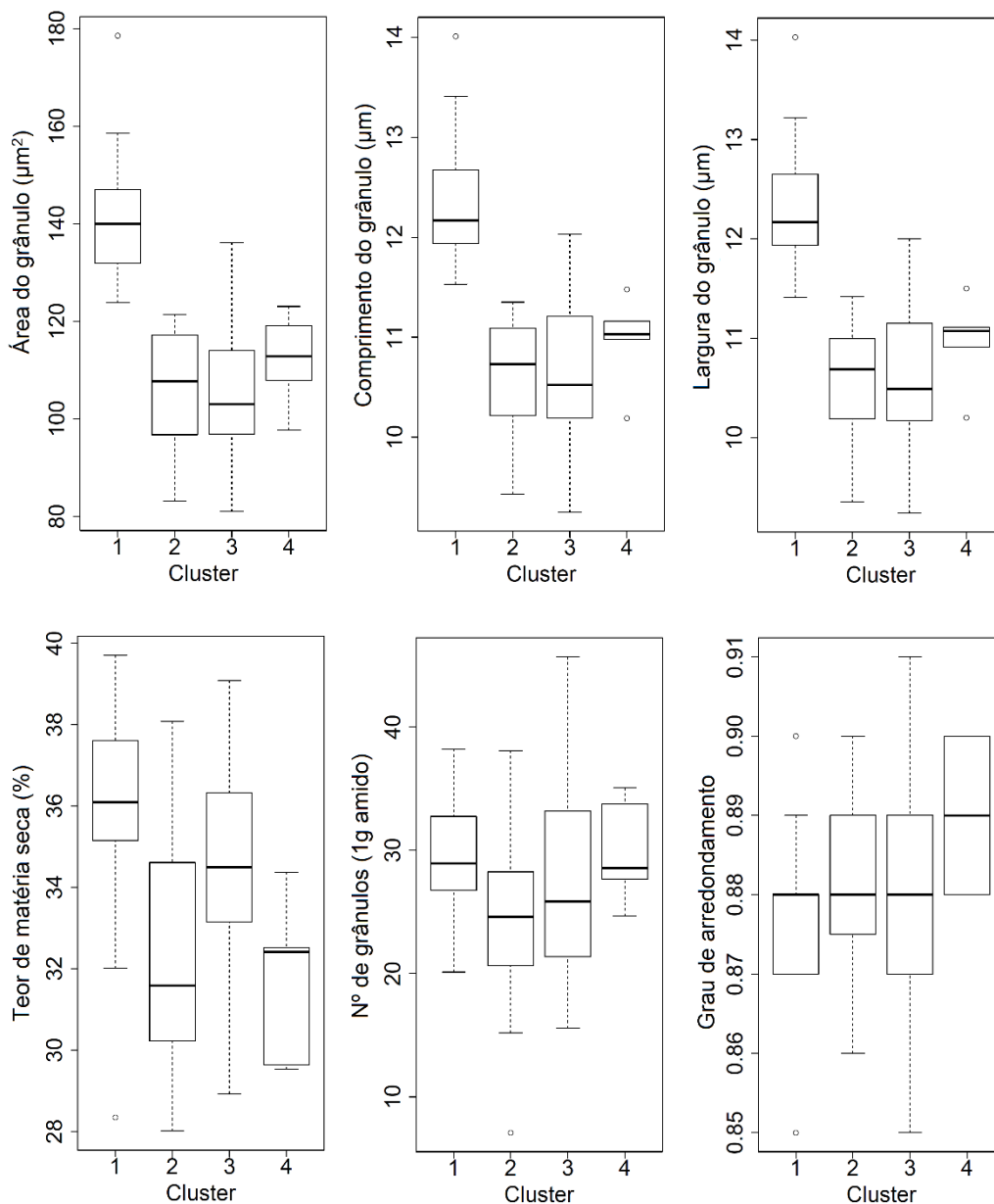


Figura 3. Box plot das características relacionadas ao grânulo de amido e da raiz, avaliadas em 56 acessos de mandioca.

O Grupo 3 foi formado por três variedades melhoradas (BRS Kiriris, BRS Poti Branca e IAC90) e 22 variedades locais (BGM0394, BGM0540, BGM0670, BGM0982, BGM0989, BGM1081, BGM1174, BGM1202, BGM1327, BGM1437, BGM1615, BGM1640, BGM2028, Corrente, BGM1458, BGM2052, BGM1110, BGM1180, BGM1667, BGM0620, BGM1370 e BGM1728). Em média este grupos possui menor tamanho de grânulo de amido (menor AG, CG e LG) e teor mais elevado de MS nas raízes. Avijala et al. (2015) observaram baixa importância das características índice de colheita, produção de raízes comerciais e teor de matéria

seca nas raízes, no estudo da diversidade genética entre 21 genótipos de mandioca de Moçambique. Entretanto, a característica MS foi importante para contribuir na diferenciação dos grupos de acessos de mandioca avaliados no presente trabalho, assim como no trabalho de Oliveira et al. (2015a).

O Grupo 4 foi constituído pela variedade melhorada (BRS Jari) e por quatro acessos de germoplasma (BGM1078, BGM1704, BGM1178 e BGM0507). Os acessos deste grupo possuem menor MS, bem como tamanho médio do grânulo de amido com tendência a serem grânulos mais arredondados em comparação com os demais acessos (Figura 3).

Os resultados do agrupamento da diversidade genética são de extrema importância no planejamento de programas de melhoramento para obtenção de híbridos e formação de populações base para futuros programas. De modo geral, acessos presentes em diferentes agrupamentos são considerados promissores em cruzamentos para geração de populações com alto nível de segregação. Entretanto, como a mandioca é uma espécie altamente heterozigótica, considerável diversidade de combinações genótípicas podem ser obtidas utilizando autofecundações. Portanto, cruzamentos de acessos pertencentes ao mesmo grupo pode ser utilizado para obtenção de ganhos genéticos mais rápidos focados em quatro temas no desenvolvimento de variedades: biofortificação (aumento no teor de carotenoides nas raízes), novas variedades de mandioca de mesa de cor branca da polpa, variedades para fins industriais com maior e menor tamanho do grânulo de amido.

Considerando MS mínimo de 30%, teor de compostos cianogênicos de manso a intermediário, e coloração da polpa amarela ou creme, os acessos BGM1178, BGM1722, BGM1690, BGM0250 e BRS Dourada, são considerados os mais promissores. Por outro lado, considerando a geração de populações segregantes para mandioca de mesa com mínimo de 35% de MS, baixo teor de compostos cianogênicos e coloração branca da polpa os acessos mais promissores são 98150-06, BGM1590, BGM1850, BGM1180, BGM0620, BGM1429, BGM1728, BGM1376, BGM1715 e BGM1313.

Para fins industriais, e portanto, independente do teor de compostos cianogênicos, mas com mínimo de 35% de MS, os acessos mais indicados para geração de populações segregantes com menor tamanho de grânulos de amido são BGM0540, BRS Dourada, BGM0982, BGM1127, BGM1437, BGM1174 e

BGM0989, enquanto que os acessos com estas mesmas características, porém com maior tamanho dos grânulos de amido são BGM1495, BGM1715, BGM1376, BGM1728, BGM1429, BGM1412 e BGM1171. Como o tamanho dos grânulos pequenos de amido se assemelham aos dos lipídeos, variedades que produzem amidos de menor tamanho podem ser úteis na indústria de alimentos como substitutos de gorduras (LEONEL, 2007). Ainda de acordo com Ceballos et al. (2008), genótipos com grânulos pequenos de amido aumenta o potencial para uso na indústria do biocombustíveis.

Considerando as propriedades de pasta de amido com tamanhos diferenciados de amido, Singh et al. (2012) relataram que o menor tamanho dos grânulos do amido de feijão-arroz (*Vigna umbellate*) foi inversamente associado ao poder de inchamento do amido, fazendo com que linhagens com maior proporção de grânulos pequenos de amido começassem a absorver água em temperaturas mais elevadas. Além disso, estes autores relataram correlação positiva entre o pico de viscosidade, retrogradação e quebra de viscosidade com linhagens detentoras de grânulos maiores de amido. Portanto, é possível que estas características do amido relatadas para feijão-arroz possam refletir em propriedades diferenciadas nos acessos pertencentes a cada um dos grupos identificados pela ACP.

A associação dos grupos formados pela ACP com a caracterização qualitativa quanto à coloração da polpa da raiz e ao teor de compostos cianogênicos é apresentada nas Figuras 4 e 5, respectivamente. O agrupamento formado pela ACP foi bastante efetivo para classificar os acessos com cor amarela da polpa no Grupo 4 e cor creme no Grupo 2, embora ainda haja acessos neste último grupo com cor branca da raiz (BGM1698, BGM1313, BGM1850, BGM1537, Fécula Branca e BRS Formosa) (Figura 4). Os acessos pertencentes aos Grupos 1 e 3, apresentam cor branca da raiz.

Ao estimarem a variação genética em acessos de mandioca, Oliveira et al. (2015a) verificaram fraca associação (0,38) entre os grupos formados com os dados quantitativos e os grupos formados pela análise conjunta (dados qualitativos: binomial e multicategóricos; e quantitativos). Isto pode indicar que a análise de dados quantitativos e qualitativos podem considerar variações genéticas em regiões genômicas bastante distintas. Contudo, os dados quantitativos relacionados às características do grânulo de amido de mandioca foram bastante

precisos no agrupamento dos acessos amarelos e cremes em grupos distintos (Figura 4).

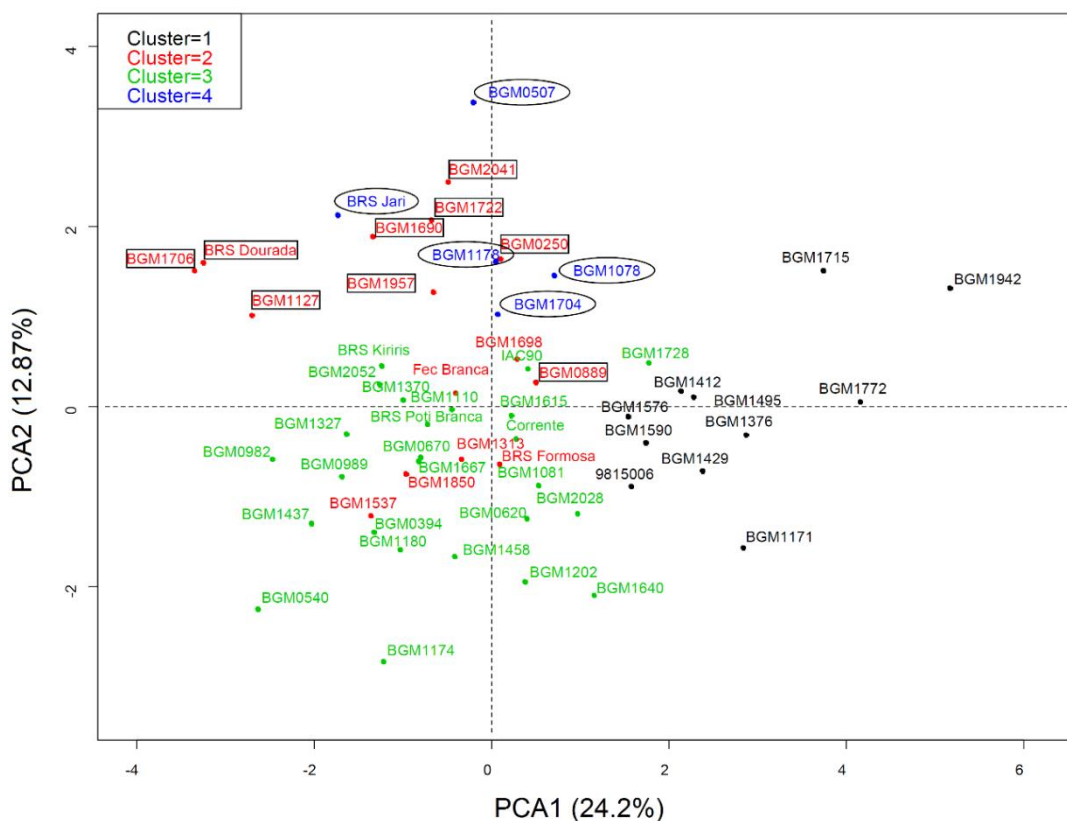


Figura 4. Gráfico bidimensional da distribuição de 56 acessos de mandioca com base em características de raiz e grânulos de amido, obtidos pela análise de componentes principais. Os quatro grupos identificados estão representados por diferentes cores. Os acessos marcados com borda retangular e ovalada possuem coloração creme e amarela na raiz, respectivamente. Os demais acessos possuem raiz branca.

Em relação à classificação quanto ao teor de compostos cianogênicos, não foi observada nenhuma consistência nos agrupamentos propostos pela ACP, pois acessos considerados bracos ($\text{HCN} > 100 \text{ ppm}$) foram alocados no Grupo 1 (BGM1171 e BGM1942), Grupo 2 (BGM1957), Grupo 3 (BGM0394, BGM0540, BGM0670, BGM0982, BGM0989, BGM1081, BGM1174, BGM1202, BGM1327, BGM1437, BGM1615, BGM1640, BGM2028 e Corrente) e Grupo 4 (BGM1078 e BGM1704) (Figura 5). O mesmo ocorreu com as demais classificações (níveis baixos e intermediários de compostos cianogênicos). Oliveira et al. (2015b)

utilizaram o algoritmo *Affinity Propagation* para agrupar 474 acessos de mandioca com base nas características: produtividade de amido, teor de matéria seca, teor de amilose e compostos cianogênicos nas raízes. Estes autores também relataram a dificuldade na classificação de acessos de mandioca com base única e exclusivamente no teor de compostos cianogênicos, em função da grande amplitude desta característica, sobretudo em dois grupos, e ausência de associação entre a estrutura genética dos acessos e a classificação em mandioca mansa e brava.

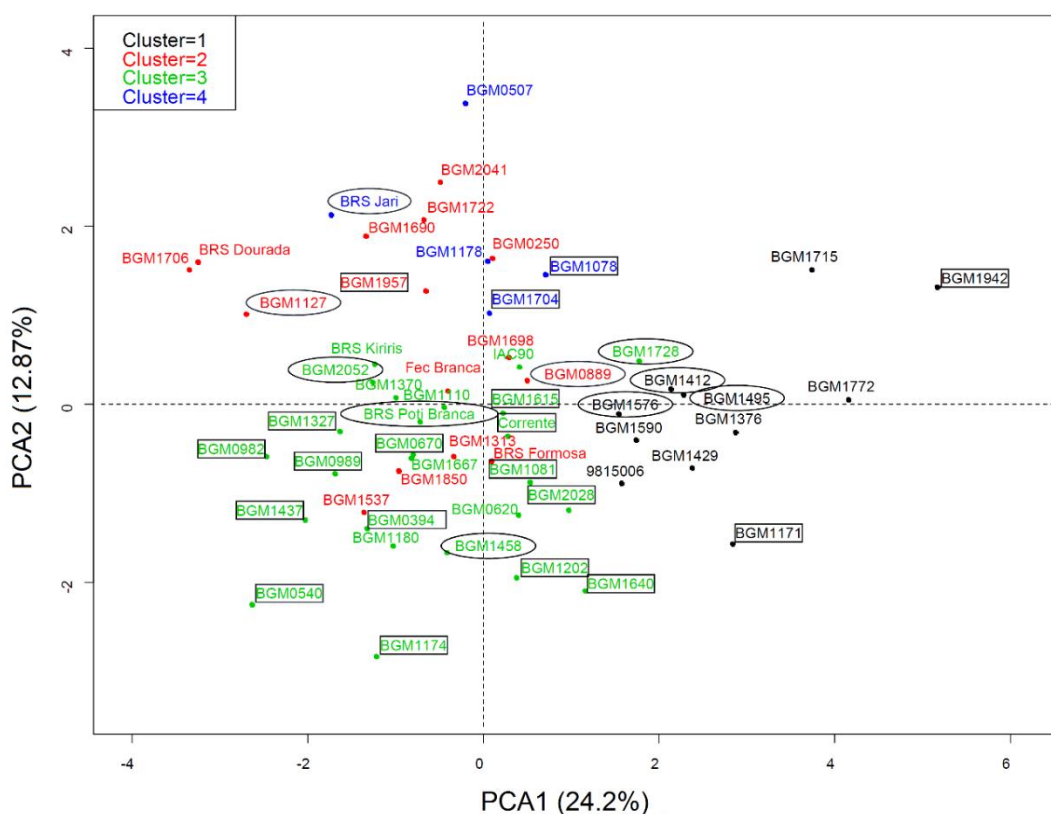


Figura 5. Gráfico bidimensional da distribuição de 56 acessos de mandioca com base em características de raiz e grânulos de amido, obtidos pela análise de componentes principais. Os quatro grupos identificados estão representados por diferentes cores. Os acessos marcados com borda retangular e ovalada possuem alto (mandioca brava) e intermediário nível de compostos cianogênicos, respectivamente. Os demais acessos possuem baixo nível de compostos cianogênicos na raiz (mansos).

A identificação e uso dos acessos disponíveis nos bancos de germoplasma de mandioca podem contribuir para melhorar a produtividade de raízes frescas e

amido. Entretanto, apesar da necessidade constante de desenvolvimento de novas variedades mais produtivas de mandioca, é preciso considerar a tendência atual das indústrias de alimentos e agricultores na busca de amidos nativos com características especiais, que poderiam substituir amidos modificados quimicamente ou abrir novas oportunidades de mercados (LEONEL, 2007). Assim, os programas de melhoramento genético também devem buscar melhorias na qualidade do amido produzido pelas novas variedades. Neste aspecto, o Brasil possui uma vantagem estratégica por ser o centro de diversidade da espécie cultivada (OLSEN, 2004; ISENDAHL, 2011), e com isso dispor de suficiente variabilidade genética para atendimento destas demandas. Conforme, demonstrado, a análise das relações genéticas entre os acessos de mandioca com base em características da raiz e do grânulo de amido é um componente importante dos programas de melhoramento, pois fornece informações cruciais para estabelecimento de populações segregantes estratificadas por objetivos voltados para qualidade do amido.

REFERÊNCIAS

AKINWALE, M.G.; AKINYELE, B.O.; DIXON, A.G.O.; ODIYI, A.C. Genetic variability among forty-three cassava genotypes in three agroecological zones of Nigeria. **African Journal of Plant Science**, v.5, p.207–212, 2010.

ALCÁZAR-ALAY, S.C., MEIRELES, M.A.A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Science and Technology**, v.35, p.215-236, 2015.

AVIJALA, M.F.; BHERING, L.L.; PEIXOTO, L.A.; CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S.; CUAMBE, C.E.; ZACARIAS, A. Genetic diversity revealed dissimilarity among Mozambican cassava cultivars. **Australasian Journal of Crop Science**, v.9, p.772-780, 2015.

BAGUMA, Y. **Regulation of Starch Synthesis in Cassava**. 2004. 44 f. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences - Department of Plant Biology and Forest Genetics. Uppsala, 2004.

CEBALLOS, H.; FAHRNEY, K.; HOWELER, R.; OSPINA, B. Cassava Potential for Bioethanol. **Symposium - Biofuels in Developing Countries: Opportunities and Risks**, p.625-628, 2008.

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

CHARLES, A.L.; CHANG, Y.H.; KO, W.C.; SRIROTH, K.; HUANG, T.C. Influence of amylopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of cassava starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2717–2725, 2005.

CHARRAD, M.; GHAZZALI, N.; BOITEAU, V.; NIKNAFS, A. Nbclust: an R package for determining the relevant number of clusters in a data set. **Journal of Statics Software**, v.61, p.1–36, 2014.

CHAVENT, M.; KUENTZ-SIMONET, V.; LABENNE, A.; SARACCO, J. Multivariate analysis of mixed data: The PCAmixdata R package, **arXiv:1411. 4911 [stat.CO]**, 2014.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, H.; TANG, M.C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.1527-1534, 2009.

ESUMA, W.; RUBAIHAYO, P.; PARIYO, A.; KAWUKI, R.S; WANJALA, B.; NZUKI, I.; HARVEY, J.J.W.; BAGUMA, Y. Genetic diversity of provitamin A cassava in Uganda. **Journal of Plant Studies**, v.1, p.60-71, 2012.

FESSENDEN, M., How the Gates Foundation Is Making Cassava the Next Corn. **The Smithsonian Magazine**, 2014.

FUKUDA, W.M.G.; GUEVARA, C.L.; KAWUKI, R.; FERGUSON, M.E. Selected morphological and agronomic descriptors for the characterization of cassava. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria, 2010.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.45, p.253-267, 2001.

HOWELER, R.; LUTALADIO, N.; THOMAS, G. Save and Grow: Cassava: A Guide to Sustainable Production Intensification, **Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome**, 2013.

ISENDAHL, C. The domestication and early spread of manioc (*Manihot esculenta* Crantz): A brief synthesis. **Latin American Antiquity**, v.22, p.452–468, 2011.

KANAGARASU, S.; JUSTINRAJ, F.; PREM JOSHUA, J.; GANESHRAM, S.; JOHN JOEL, A. Exploration and collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Western Ghats and characterisation for industrial use. **Research Journal of Recent Science**, v.3, p.248-255, 2014.

KAWANO, K.; DAZA, P.; AMAYA, A.; RÍOS, M.; GONÇALVEZ, M.F. Evaluation of cassava germplasm for productivity. **Crop Science**, v.18, p.377–380, 1978.

KAWUKI; R.S.; FERGUSON, M.; LABUSCHAGNE, M.T.; HERSELMAN, L.; ORONE, J.; RALIMANANA, I.; BIDIKA, M.; LUKOMBO, S.; KANYANGE, M.C.; GASHAKA, G.; MKAMILO, G.; GETHI, J.; OBIERO, H. Variation in qualitative and quantitative traits of cassava germplasm from selected national breeding programmes in sub-Saharan Africa. **Field Crops Research**, v.122, p.151–156, 2011.

KIZITO, E.; RONNBERG-WASTLJUNG, AC.; EGWANG, T.; GULLBERG, U.; FREGENE, M.; WESTERBERGH, A. Quantitative trait loci controlling cyanogenic glucoside and dry matter content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. **Hereditas**, v.144, p.129-136, 2007.

LAWAL, O.S.; LAPASIN, R.; BELLICH, B.; OLAYIWOLA, T.O.; CESARO, A.; YOSHIMURA, M.; NISHINARI, K. Rheology and functional properties of starches isolated from five improved rice varieties from West Africa. **Food Hydrocolloid**, v.25, p.1785–92, 2011.

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

LINDEBOOM, N.; CHANG, P.R.; TYLER, R. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of granule size, with emphasis on small granule starches: A review. **Starch**, v.56, p.89-99, 2004.

MKUMBIRA, J.; CHIWONA-KARLTUN, L.; LAGERCRANTZ, U.; MAHUNGU, N.M. Classification of cassava into 'bitter' and 'cool' in Malawi: From farmers perception to characterisation by molecular markers. **Euphytica**, v.132, p.7–22, 2003.

MOLEND, M.; STASIAK, M.; HORABIK, J.; FORMAL, J.; BLASZCZAK, W., ORNOWSKI, A. Microstructure and mechanical parameters of five types of starch. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.15, p.161, 2006.

MTUNGUJA, M.K.; THITISAKSAKUL, M.; MUZANILA, Y.C.; WANSUKSRI, R.; PIYACHOMKWAN, K.; LASWAI, H.S.; BECKLES, D.M. Assessing variation in physicochemical, structural, and functional properties of root starches from novel Tanzanian cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) landraces. **Starch-Stärke**, v.68, p.1-14, 2016.

MURPHY, P. Starch. In: PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A. Handbook of hydrocolloids. CRC press, INc., **Boca Rotan**, 2000.

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

NJOKU, D.N.; GRACEN, V.E.; OFFEI, S.K.; ASANTE, I.K.; EGESI, C.N.; KULAKOW, P.; CEBALLOS, H. Parent-offspring regression analysis for total carotenoids and some agronomic traits in cassava. **Euphytica**, v.206, p.657–666, 2015.

NUWAMANYA, E.; BAGUMA, Y.; EMMAMBUX, N.; TAYLOR, J.; PATRICK, R. Physicochemical and functional characteristics of cassava starch in Ugandan varieties and their progenies. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v.2, p.001-011, 2010.

OLIVEIRA, E.J.; OLIVEIRA FILHO, O.S.; SANTOS, V.S. Classification of cassava genotypes based on qualitative and quantitative data. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.906-924, 2015a.

OLIVEIRA, E.J.; SANTANA, F.A.; OLIVEIRA, L.A.; SANTOS, V.S. Genotypic variation of traits related to quality of cassava roots using affinity propagation algorithm. **Scientia Agricola**, v.72, p.53-61, 2015b.

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

ONWUKA, G.I. Food Analysis and Instrumentation. Theory and Practice. Naphthali Prints, 2005, 140-146.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>. Acesso em: 18 Dez. 2015.

ROLLAND-SABATÉ, A.; SÁNCHEZ, T.; BULÉON, A.; COLONNA, P.; JAILLAIS, B.; CEBALLOS, H.; DUFOUR, D. Structural characterization of novel cassava starches with low and high-amylose contents in comparison with other commercial sources. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.161-174, 2012.

SANOUSI, A.F.; LOKO, L.Y.; AHISSOU, H.; ADJAH, A.K.; OROBIYI, A.; AGRÉ, A.P.; AZOKPOTA, P.; DANSI, A.; SANI, A. Diversity, physicochemical and technological characterization of elite cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars of Bantè, a district of Central Benin. **The Scientific World Journal**, ID 674201, 2015.

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

SINGH, N.; KAUR, S.; ISONO, N.; ICHIHASHI, Y.; NODA, T.; KAUR, A.; RANA, J.C. Diversity in characteristics of starch amongst rice bean (*Vigna umbellata*) germplasm: Amylopectin structure, granules size distribution, thermal and rheology. **Food Research International**, v.46, p.194–200, 2012.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v.81, p.219-231, 2003.

TAYLOR, N.J., FAUQUET, C.M., TOHME, J. Overview of Cassava special issue. **Tropical Plant Biology**, v.5, p.1–3, 2012.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.151-165, 2004.

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

UPADHYAYA, H.D.; DWIVEDI, S.L.; GOWDA, C.L.L.; SINGH, S. Identification of diverse germplasm lines for agronomic traits in a chickpea (*Cicer arietinum* L.) core collection for use in crop improvement. **Field Crops Research**, v.100, p.320-326, 2007.

VAMADEVAN, V., BERTOFT, E. Structure-function relationships of starch components. **Starch-Stärke**, v.67, p.55-68, 2015.

WANI, A.A.; SINGH, P.; SHAH, M.A.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; GUL, K.; WANI, I.A. Rice starch diversity: effects on structural, morphological, thermal, and physicochemical properties - a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11, p.417-436, 2012.

WICKRAMASINGHE, H.A.M.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C., YAMAUCHI, H.; NODA, T. Comparative analysis of starch properties of different root and tuber crops of Sri Lanka. **Food Chemistry**, v.112, p.98–103, 2009.

ZHOU, M.; ROBARDS, K.; GLENNIE-HOLMES, M.; HELLIWELL, S. Structure and pasting properties of oat starch. **Cereal Chemistry**, v.75, p.276–281, 1998.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O elevado polimorfismo molecular identificado nos seis genes da rota metabólica de amido, representam uma ferramenta de análise importante do germoplasma de mandioca. Por outro lado, o agrupamento dos acessos com base nestes polimorfismos, não foi capaz de revelar uma clara distinção entre os agrupamentos, considerando alguns caracteres fenotípicos da raiz e a origem dos genótipos analisados. Não houve associação dos SNPs com teor de matéria seca nas raízes. Entretanto, os SNPs identificados nestes genes serão úteis em futuras validações de estudos associativos para as propriedades da pasta do amido.

Foram encontradas diferenças significativas, entre as médias dos 56 acessos de mandioca avaliados para todas as características quantitativas relacionadas ao grânulo de amido. Correlações positivas foram observadas entre as características AG x LG (0,98), AG x CG (0,98) e entre LG x CG (0,99), e, correlação negativa de moderada magnitude foi observada entre as características CorPolpa x MS (-0,43), indicando que acessos com coloração da polpa mais amarelada tenderam a apresentar menor teor de matéria seca nas raízes. Esta correlação negativa é extremamente indesejável, uma vez que variedades de mandioca com maior teor de carotenoides também devem possuir maior MS, em função da preferência dos agricultores e indústrias. Estas informações devem guiar as estratégias para escolha futura de parentais para os programas de biofortificação.

Como os grânulos podem influenciar nas propriedades físico-químicas do amido, este estudo pode contribuir para orientação daqueles mais promissores para diversas aplicações industriais, após uma análise mais detalhada das propriedades da pasta dos acessos pertencentes aos diferentes agrupamentos, de forma a substituir amidos modificados quimicamente ou abrir novas oportunidades de mercados.