

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E SELEÇÃO  
ASSISTIDA POR MARCADORES PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO  
MOSAICO AFRICANO NA CULTURA DA MANDIOCA**

**CATIA DIAS DO CARMO**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**JULHO – 2014**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E SELEÇÃO  
ASSISTIDA POR MARCADORES PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO  
MOSAICO AFRICANO NA CULTURA DA MANDIOCA**

**CATIA DIAS DO CARMO**

Engenheira Florestal

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), 2009.

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

**Orientador: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS – BAHIA – 2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

|      |   |
|------|---|
| C287 | <p>Carmo, Catia Dias do</p> <p>Desenvolvimento de ferramentas moleculares e seleção assistida por marcadores para resistência ao vírus do mosaico africano na cultura da mandioca / Catia Dias do Carmo. - Cruz das Almas, BA, 2014.</p> <p>102f.; il.</p> <p>Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup>. Eder Jorge de Oliveira</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB.</p> <p>1. Mandioca – Melhoramento genético. 2. Mandioca – Doenças e pragas. 3. Vírus do mosaico da mandioca. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB. II. Título.</p> <p>CDD: 633.682</p> |
|------|---|

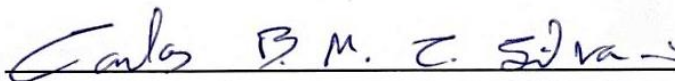
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA  
CATIA DIAS DO CARMO**



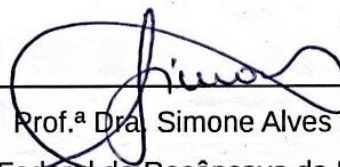
---

Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Orientador



---

Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



---

Prof.ª Dra. Simone Alves Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

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

A todos os que acreditam que a pesquisa pode fazer  
a diferença, a minha razão Dona Dinha e Seu  
Antônio e a todos que amo **dedico**.

## AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu orientador Eder Jorge pela confiança, serenidade e principalmente paciência. Por sempre primar a construção do conhecimento, o trabalho em equipe, pela exigência e pela disponibilidade.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular que compartilharam seus ensinamentos e amizade: A Maiane pelos primeiros ensinamentos; a Dalma e a Vandeson pela dedicação e companhia sempre (*Mi manchi*) e pelo apoio na obtenção dos dados; a Gilmara pelas valiosas dicas de logística (“cola em mim que você brilha”); a Marciane pela companhia no “busão”, conselhos e por partilhar sua experiência e conhecimento sobre BioMol; a Patricia (flor-de-maracujá) que sempre me salvava na volta para casa e pelas deliciosas conversas; a Luziane sempre minuciosa e prestativa; as analistas Fernanda e Andresa que com o bom trabalho prestados a unidade proporcionaram o bom funcionamento do laboratório; ao seu Raimundo pela experiência partilhada; a Rogério por ouvir atentamente minhas dúvidas e pela disponibilidade em partilhar seu conhecimento; aos novos habitantes do laboratório Zanon, Priscila “equipe Cláudia”: Paulo e suas filhas Carol, Náira, Iane e as antigas habitantes do laboratório Rafaela, Chirlei, Adila e Janaíra pela descontração e conhecimentos transmitidos.

As amigas/filhas/irmãs Elaine, Letícia, Selma e Poli com quem tive a felicidade/sorte/prazer de partilhar a mesma casa e a vida cotidiana durante o mestrado. Pelo cuidado de sempre com meus horários de almoço e pela convivência sincera: uma verdadeira família.

A Josivania e a Cinara pelas boas risadas, passeios e guloseimas. Também a Adriana Fiuza que gentilmente cedeu o mobiliário do quarto para minha estadia em Cruz das Almas e pelas conversas e delícias servidas na sua casa. Ao Sr. Duda, meu “moto táxi favorito”, por prestar sempre com honestidade e cuidado seu serviço. A companheira de orientação Marcela, pelo apoio de sempre e por partilhar de sua história e sentimentos (geralmente comuns aos meus). Aos demais colegas do curso de pós-graduação, em especial a Valber e aos amigos conquistados nessa cidade pelo convívio e troca de conhecimentos.

Aos professores Alessandro de Paula e Avaldo de Oliveira Soares Filho da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e a toda equipe de trabalho do Centro Territorial de Educação Profissional – Vitória da Conquista que tanto contribuíram na minha formação profissional e que sempre incentivaram o ingresso no mestrado.

A minha família pela compreensão da ausência. Ao meu pai e a minha mãe pelo apoio de sempre. A minha irmã Cassia e seu digníssimo Michael, que sempre me abrigaram nos fins de semana e pelas deliciosas discussões sobre ciência geral. A Diogo, meu companheiro, pela atenção dada a minhas dúvidas, pelos momentos de reflexão, leituras, pesquisas e discussões fundamentais no aprimoramento das minhas ideias, pelos conselhos e amparo constante.

Aos membros da banca, Prof. Carlos Bernard e Prof<sup>a</sup>. Simone, pelas sugestões para a melhoria desse trabalho.

A todos que a falta de memória não permitiu nomear e que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

**Muito obrigada!**

**“Tudo que é demais é sobra.”**

Meu pai sempre diz.

**“Guarda o que comer não o que fazer.”**

Minha mãe sempre diz.

Sugiro a leitura dos artigos:

**“Darwin e a prática da 'Salami Science'”** disponível em:

<http://www.estadao.com.br/noticias/impresso,darwin-e-a-pratica-da-salami-science,1026037,0.htm>

**“Salami Science x Ping Pong Science”** disponível em:

<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detailhe.php?id=91320>

**“Avaliação acadêmica: muito além do jardim”** disponível em:

<http://blogconvergencia.org/blogconvergencia/?p=1915>



## SUMÁRIO

|   | Página |
|---|--------|
| RESUMO  |        |
| ABSTRACT  |        |
| INTRODUÇÃO.....   | 1      |
| <b>Capítulo I</b>   |        |
| DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES TRAP ( <i>Target Region Amplification Polymorphism</i> ) COMO NOVA FERRAMENTA MOLECULAR PARA ANÁLISES GENÉTICAS NA CULTURA DA MANDIOCA..... | 18     |
| <b>Capítulo II</b>  |        |
| SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA AO <i>Cassava Mosaic Disease</i> NA CULTURA DA MANDIOCA.....  | 60     |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 101    |

# DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES E SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO AFRICANO NA CULTURA DA MANDIOCA

Autora: Catia Dias do Carmo

Orientador: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar marcadores do tipo TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), bem como selecionar acessos com genes de resistência ao vírus do mosaico africano via seleção assistida por marcadores (SAM). Foram desenvolvidos e validados iniciadores TRAP com alto polimorfismo, baixo custo operacional e fácil implementação. Das 396 combinações, as 69 mais polimórficas foram utilizadas na caracterização de 46 acessos de germoplasma, cujos valores de conteúdo de informação polimórfica e poder de resolução foram maiores que 0,25 e 3,21, respectivamente. Estes TRAPs estão associados a regiões gênicas relacionadas a biossíntese de amido, carotenoides, compostos cianogênicos, deterioração fisiológica pós-colheita, formação de raízes tuberosas e respostas de defesa. Em relação à identificação de fontes de resistência ao CMD foram identificados sete acessos que apresentaram alelos ligados ao gene *CMD2*. A análise discriminante de componentes principais (ADCP) das sete fontes de resistência ao CMD juntamente com 17 variedades elite de mandioca indicou a formação de três grupos de divergência, na qual as fontes de resistência ao CMD foram alocadas em dois diferentes grupos. As baixas estimativas de parentesco genômico (variação de -0,167 a 0,681, média de 0,076), contribuíram para o sucesso na orientação de cruzamentos contrastantes para geração de populações segregantes.

**Palavras-chave:** Marcadores moleculares, Diversidade genética, Seleção Assistida, Vírus do Mosaico Africano, TRAP.

## DEVELOPMENT OF MOLECULAR TOOLS AND MARKER ASSISTED SELECTION FOR RESISTANCE TO CASSAVA MOSAIC DISEASE

Author: Catia Dias do Carmo

Advisor: Eder Jorge de Oliveira

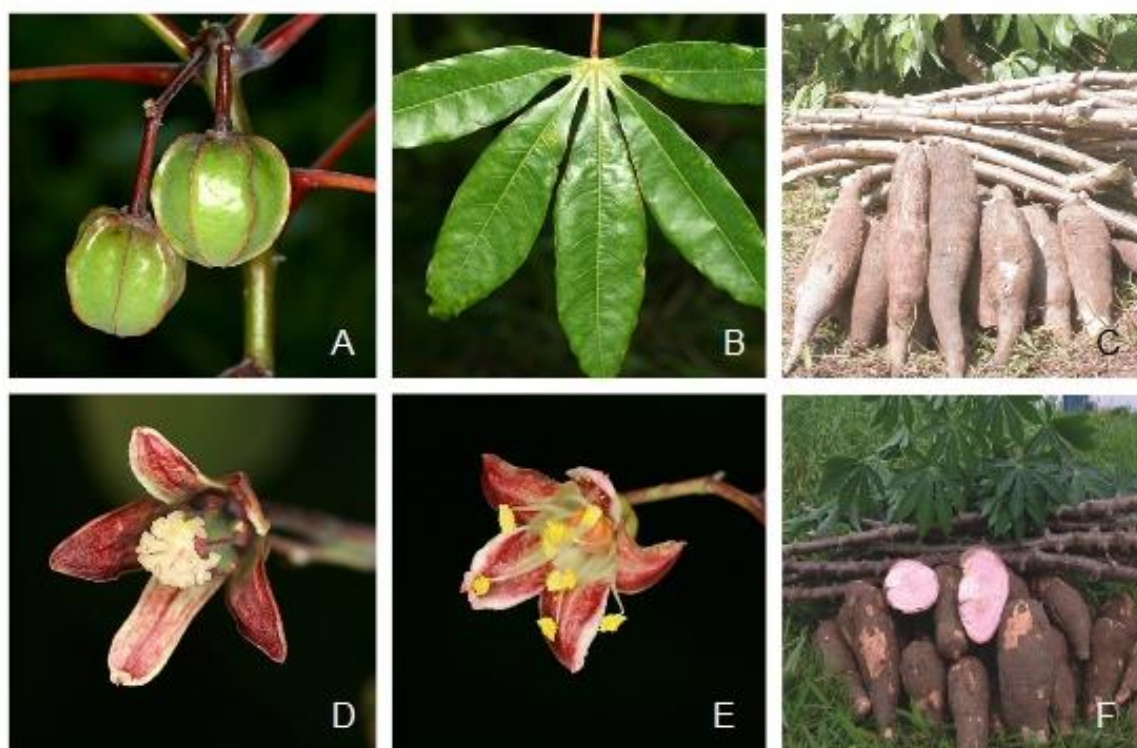
**ABSTRACT:** This study aimed to develop and characterize TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) markers in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as well as select accessions with genes related to the resistance to Cassava Mosaic Disease (CMD) through marker-assisted selection (MAS). TRAP markers with high polymorphism, low operating cost and easy implementation were developed and validated. From 396 combinations, the 69 most polymorphic were used to characterize 46 germplasm accessions whose polymorphic information content and resolving power values were greater than 0.25 and 3.21, respectively. These TRAPs are associated with genic regions related to starch and carotenoids biosynthesis, cyanogenic compounds, post-harvest physiological deterioration, root formation and defense responses. Regarding the identification of CMD resistance sources, seven accessions which presented alleles linked to *CMD2* gene were identified. The discriminant analysis of principal components (DAPC) of the seven CMD resistance sources along with 17 elite cassava varieties indicated the formation of three divergence groups in which the CMD resistance sources were divided into two different groups. The low estimates for genomic relatedness (range -0.167 to 0.681, average 0.076), contributed to the successful orientation of contrasting crosses to generate segregating populations.

**Key words:** Molecular marker, Genetic diversity, Marker Assisted Selection, Cassava mosaic disease, TRAP

## INTRODUÇÃO

### Aspectos gerais da cultura da mandioca

A *Manihot esculenta* Crantz, família Euphorbiaceae Juss. é uma planta perene, arbustiva, apresentando de 1 a 3m de altura, com folhas simples pecioladas, fruto do tipo cápsula e inflorescência do tipo panícula (Figura 1) sendo a espécie cultivada<sup>1</sup> da cultura (Descrição detalhada em Rogers 1965).



**Figura 1:** Aspectos botânicos da espécie *Manihot esculenta* Crantz. A: Fruto do tipo cápsula; B: Folha simples palmada; C: Manivas e raízes da variedade “BRS Tapioqueira”; D: Inflorescência feminina; E: Inflorescência masculina; F: Folhas, manivas e raízes da variedade “BRS Rosada”.

**Fonte:** A, B, D e E - Fotografia de C. Gracie, Herbário on line New York Botanical Garden Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=980092>> Fonte: C e F Embrapa Mandioca e Fruticultura (Folder de divulgação).

<sup>1</sup> Entende-se por “espécie cultivada” o descrito no Decreto nº 2.519 que promulga a Convenção sobre Diversidade Biológica (Espécie domesticada ou cultivada significa espécie em cujo processo de evolução influenciou o ser humano para atender suas necessidades).

Amplamente cultivada nos trópicos é propagada vegetativamente (popularmente por secções do caule denominadas de manivas), apesar de haver reprodução sexuada pela presença de inflorescências masculinas e femininas na mesma planta (monoica) (Figura 1) e polinização cruzada (alógama) devido à ocorrência de protoginia (GRANER, 1942) realizada principalmente por abelhas (SILVA et al., 2001).

No gênero *Manihot* são relatadas 98 espécies (ORLANDIN e LIMA, 2014) das quais 76 no Brasil (66 endêmicas) (CORDEIRO et al., 2014). Há indícios que a domesticação da espécie cultivada (*M. esculenta*) ocorreu na América Latina mais precisamente no sudoeste da Amazônia sendo levada para o continente africano pelos europeus e posteriormente ao continente asiático (CEBALLOS et al., 2004). No entanto, 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).

Algumas características sugerem um metabolismo intermediário C3 e C4 (EL SHARKAWY et al., 1989), comportamento diploide  $2n=36$  (CARVALHO e GUERRA, 2002) e ampla adaptação a diversas condições de clima e solo. Requer baixo investimento em capital e trabalho, tolera a seca e solos ácidos e de baixa fertilidade e se recupera rapidamente de danos causados por pragas e doenças (CEBALLOS et al., 2012).

A produção mundial de mandioca no ano de 2013 foi de mais de 276,0 milhões de toneladas com destaque para a Nigéria, Indonésia e Brasil (FAO, 2014). No Brasil, a mandioca é produzida de Norte a Sul do país em diferentes condições edafoclimáticas com estimativa de 23,4 milhões de toneladas para 2014 (um aumento de 10,4% em relação ao ano de 2013) (IBGE, 2014a). O Nordeste brasileiro possui a maior estimativa de aumento da produção para este ano (25,2%) seguindo do Norte (6,4%), Sudeste (13,6%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (2,2%) (IBGE, 2014a). O estado do Pará se destaca como maior produtor de mandioca (4,7 milhões de toneladas) (IBGE, 2014b) cuja principal finalidade é a produção da farinha de mesa (SANTANA et al., 2010). Em contrapartida, a maior concentração de indústrias de fécula do país está localizada no estado do Paraná (FELIPE et al., 2013) onde a produção também é expressiva, sendo 4,07 milhões de toneladas produzidas em 2014 (IBGE, 2014b).

Considerando a variedade como um insumo de produção, é preciso desenvolver novos materiais para atender as diferentes exigências de mercado. Variedades para a indústria, por exemplo, devem possuir características como produtividade, alto teor de matéria seca e de amido, enquanto para consumo humano as características de cozimento e coloração da raiz são mais importantes (CEBALLOS et al., 2012).

Apesar da forte competitividade brasileira a expansão da cultura da mandioca esbarra em alguns entraves importantes, como o reduzido tempo de prateleira, ocasionado pela deterioração fisiológica pós-colheita (BORGES et al., 2002), baixa produtividade em comparação com o potencial da cultura (FELIPE et al., 2013) e a baixa resistência a pragas e doenças.

O desenvolvimento de variedades com todas estas características constitui-se um grande desafio para o melhoramento da cultura, sobretudo quando associado ao período variável de floração, a baixa produção de sementes e a alta heterozigose inerente da cultura (CEBALLOS et al., 2012; FERGUSON et al., 2012). Além disso, a capacidade de atendimento da demanda por novas variedades é um grande desafio, principalmente devido ao longo período necessário para o desenvolvimento de uma nova cultivar<sup>2</sup>, que está em torno de 8 a 10 anos (OKOGBENIN et al., 2012; FERGUSON et al., 2012). Neste caso, a utilização de estratégias para agilizar a seleção de genótipos com características de interesse e/ou direcionar a introgressão de alelos tem ganhado espaço nos programas de melhoramento.

Como o Brasil é considerado o centro de origem e diversidade da mandioca (OLSEN e SCHAAL, 2001), é crucial que o país conserve e utilize estes recursos genéticos para o desenvolvimento de variedades que atendam as expectativas dos agricultores. Atualmente, o germoplasma de mandioca encontra-se mantido em coleções de trabalho e bancos ativos de germoplasma distribuídos em vários países e instituições. Dentre eles podemos citar o da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA com sete bancos de germoplasma de mandioca regionalizados e mantidos nos principais ecossistemas: Embrapa Cerrados – DF; Embrapa Clima Temperado - RS, Embrapa Semiárido - PE, Embrapa Amazônia

---

<sup>2</sup> O termo “nova cultivar” é utilizado segundo Lei nº 9.456 Art. 3 (nova cultivar: a cultivar que não tenha sido oferecida à venda no Brasil há mais de doze meses em relação à data do pedido de proteção e que, observado o prazo de comercialização no Brasil, não tenha sido oferecida à venda em outros países, com o consentimento do obtentor, há mais de seis anos para espécies de árvores e videiras e há mais de quatro anos para as demais espécies).

Oriental - PA, Embrapa Amazônia Ocidental - AM, Embrapa Hortaliças - DF e Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA (EMBRAPA/ALELO, 2014). 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 de *Manihot* com 600 acessos. Em nível internacional destacamos o Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT na Colômbia com 6.592 acessos sendo 5.709 clones de *M. esculenta* e 883 de outras espécies do gênero *Manihot* mantidos *in vitro* (CIAT, 2014) e o Instituto Internacional de Agricultura Tropical – IITA com 3.746 acessos (IITA, 2014). Por outro lado, a falta de documentação e caracterização é apontada por Queiróz (1999) e Fukuda et al. (1999) como principal entrave na utilização destes recursos genéticos conservados.

Mesmo com restrições em relação à disponibilidade de informações completas de todo o germoplasma, avanços importantes tem sido alcançados na exploração da diversidade do gênero *Manihot*, a exemplo do desenvolvimento das variedades BRS Kiriris registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA n.º10711 (resistência à podridão de raízes e alta produtividade), BRS Verdinha registro MAPA n.º23265 (adaptada às condições de seca), BRS Tapioqueira registro MAPA n.º23264 e BRS Caipira registro MAPA n.º23262 (alto teor de amido) lançadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura para fins industriais em distintas regiões do Brasil (ARAÚJO e ALMEIDA, 2013).

### **Marcadores moleculares na cultura da mandioca**

A caracterização molecular constitui-se uma importante ferramenta para as atividades de conservação e melhoramento de espécies. O nível de análise dos marcadores moleculares pode ser bioquímico ou ácido nucleicos de origem nuclear, mitocondrial ou cloroplastidial. 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), em relação ao poder de discriminação da

frequência gênica (codominantes e dominante) e ainda de acordo como a informação alvo (ANDERSEN e LUBBERSTEDT, 2003), a exemplo de:

- Marcadores Randômicos – polimorfismo gerado de forma aleatória no genoma não sendo necessário conhecimento prévio das sequências flanqueadoras;
- Marcadores Gene-alvo – polimorfismo gerado dentro de genes;
- Marcadores Funcionais – derivados de polimorfismo nos genes com relação comprovada entre a variação do genótipo e o fenótipo expresso.

Características desejáveis a qualquer tipo de marcador molecular incluem: polimorfismo e distribuição uniforme por todo o genoma; geração de múltiplos marcadores, independentes e confiáveis; baixo custo e praticidade da técnica; possibilidade de análise com quantidades de tecido e DNA limitadas; ter ligação com fenótipos distintos e não requerer informação prévia sobre o genoma do organismo (AGARWAL et al., 2008).

Especificamente na cultura da mandioca, os marcadores moleculares baseados no DNA têm sido utilizados para conservação, melhoramento e em estudos de filogenia das espécies do gênero *Manihot*. Na conservação e nas atividades de pré-melhoramento trabalhos de diversidade e variabilidade e de identificação de duplicatas são mais proeminentes. No âmbito do melhoramento, os usos se concentram no mapeamento de QTLs relacionadas a rotas importantes para a cultura, *fingerprint* de variedades e seleção de parentais.

Um dos primeiros trabalhos relatados sobre o uso de marcadores moleculares na cultura foi feito por Marmey et al. (1994) para estudo de diversidade genética do gênero *Manihot* com marcadores RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Após, o uso conjunto de marcadores RFLP e RAPD, microssatélites e isoenzimas (FREGENE et al., 1997), e marcadores AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (FREGENE et al., 2000) marcam a primeira utilização de marcadores moleculares na construção de mapas genéticos na espécie cultivada.

Marcadores moleculares randômicos ainda foram utilizados para avaliar a relação entre espécies do gênero *Manihot* por marcadores AFLP (ROA et al., 1997) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (SILVA et al., 2011) e na detecção de variabilidade em etnovariiedades (MÜHLEN et al., 2000) e acessos elites de mandioca (VIEIRA et al., 2010), assim como na caracterização de coleções de



germoplasma (MARMEY et al., 1994; COLOMBO et al., 2000; CARVALHO e SCHAAL, 2001; COSTA et al., 2003; ZACARIAS et al., 2004).

Microssatélites foram utilizados na cultura da mandioca para a identificação de duplicatas em coleções (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 1999; MOURA et al., 2013), análise de diversidade de germoplasma (SIQUEIRA et al., 2009; BANG et al., 2011; MEZZETE et al., 2013), e mapeamento genético (OKOGBENIN et al., 2006; WHANKAEW et al., 2011). Ainda em relação ao mapeamento da cultura foram desenvolvidos e mapeados 127 microssatélites oriundos de bibliotecas enriquecidas (MBA et al., 2001) utilizados posteriormente no mapeamento da resistência ao mosaico africano (AKANO et al., 2002) e na caracterização de etnovariedades (SARDOS et al., 2008).

Por outro lado, com o sequenciamento do genoma de *M. esculenta* (PROCHNIK et al., 2012) aliado ao uso da bioinformática é possível desenvolver novas ferramentas moleculares ainda limitadas para a cultura da mandioca com ampla cobertura genômica. Ademais, até o presente momento, 86.310 sequências expressas (*Expressed Sequence Tag – ESTs*) foram anotadas em bancos de dados como NCBI *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) relacionadas a diversas rotas metabólicas (NCBI, 2014) importantes para o melhoramento da cultura e possibilitando o desenvolvimento de marcadores relacionados a genes candidatos. Com base em sequências expressas podemos citar o desenvolvimento de microssatélites (LOKKO et al., 2007) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (FERGUSON et al., 2012) relacionados à tolerância à seca; e a mineração de regiões contendo microssatélites em mandioca realizadas por Tangphatsornruang et al. (2008), Raji et al. (2009) e Zou et al. (2011) em bibliotecas de ESTs com uso de ferramentas da bioinformática. Partindo dessa estratégia, a obtenção de marcadores possui um menor custo, pode ser feita de maneira rápida e com seleção prévia dos iniciadores alvo em regiões que apresentam maior polimorfismo. Neste sentido, o desenvolvimento de marcadores relacionados a genes candidatos é proposto pela técnica *Target Region Amplification Polymorphism - TRAP* (HU e VICK, 2003), até então não relatada para a cultura da mandioca.

Na cultura da mandioca, os marcadores moleculares também têm sido utilizados na Seleção Assistida por Marcadores moleculares (SAM), sobretudo para a seleção de genótipos resistentes ao vírus do mosaico africano (OKOGBENIN et

al., 2007, 2012; RIBEIRO et al., 2012, RABBI et al., 2014) e ao ácaro verde (BLAIR et al., 2007). Marcadores utilizados na seleção assistida devem estar próximos à região de interesse para maior acurácia e minimização da possibilidade de ocorrência de falsos positivos por recombinação (COLLARD e MACKILL, 2008). Como o próprio nome sugere, a SAM consiste na seleção de genótipos com características de interesse para o melhoramento, de forma indireta com uso de marcadores moleculares. Ainda permite a piramidação de genes, onde se busca concentrar em um único genótipo, diferentes características de interesse.

### **Viroses da mandioca**

No Brasil, as viroses de maior expressão na cultura da mandioca são o vírus do mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*), mosaico comum (*Cassava common mosaic virus*) e o couro de sapo (*Cassava frogskin disease*). O mosaico comum é transmitido pelas estacas utilizadas na reprodução comercial da espécie ou por inoculação mecânica do vírus (CALVERT et al., 1996). O controle pode ser feito com a eliminação das plantas com sintomas da doença. Em relação ao mosaico das nervuras, este ocorre principalmente nas regiões semiárido do nordeste brasileiro com sintomas esporádicos e geralmente menos aparentes no final do ciclo de crescimento (CALVERT e THRESH, 2002) ambos com impactos pouco expressivos na produtividade da cultura. Em contrapartida, o couro de sapo pode causar perdas de 50% a 100% na produção agravado pela não ocorrência de sintomas na parte aérea o que dificulta o diagnóstico precoce e o controle da virose. Plantas afetadas pelo couro de sapo apresentam-se com sintomas hiperplásticos tipo verrugose tornado as raízes finas com zona cortical grossa, quebradiça, enrugada e fendas retículo-alveolares (POLTRONIERI et al., 1999).

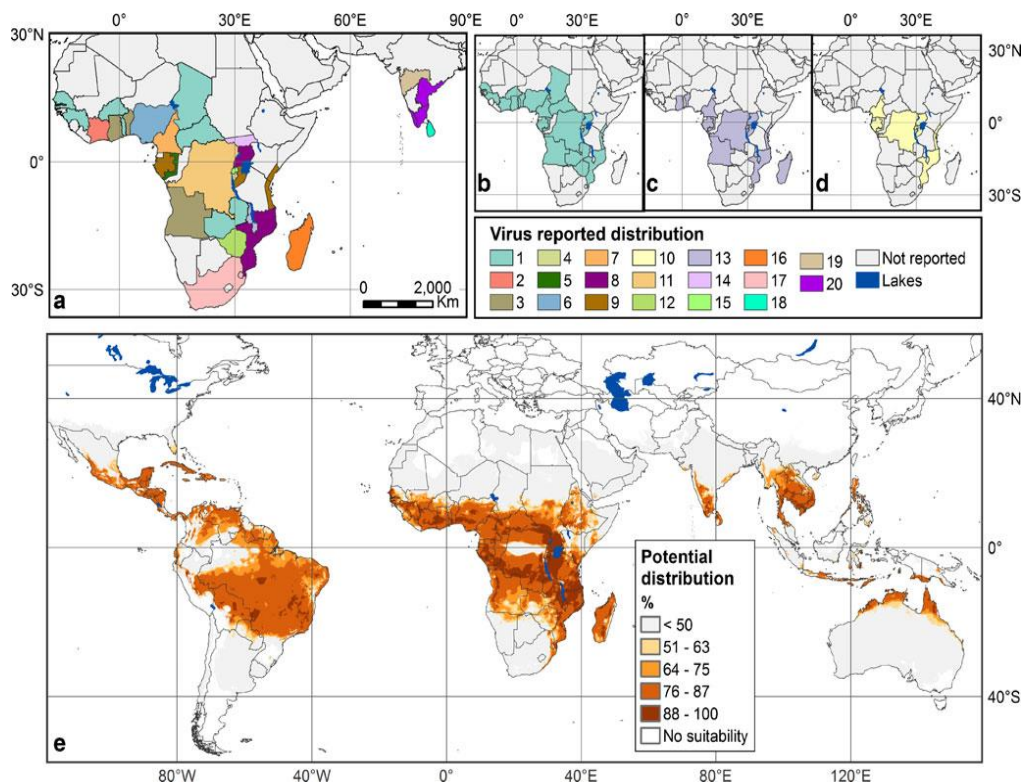
No continente africano e asiático o complexo de vírus conhecido como CMD (*Cassava Mosaic Disease*) provocou perdas de até 100% da produção de mandioca (THRESH et al., 1994) sendo a virose de maior importância nessa região. O mosaico africano é uma virose endêmica provocada por várias espécies de *Cassava mosaic geminiviruses* - (CMGs) (família Geminiviridae: Gênero: Begomovirus) e algumas novas variantes que surgem por recombinação (LEGG e FAUQUET 2004; BULL et al., 2006; TIENDRÉBÉOGO et al., 2012). Os CMGs têm como centro de diversidade a África Ocidental (TIENDRÉBÉOGO et al., 2012) e suas principais espécies incluem: *African cassava mosaic virus* – ACMV, *East African cassava mosaic virus* –

EACMV, *East African cassava mosaic Cameroon virus* – EACMCV, *East African cassava mosaic Kenya virus* – EACMKV, *East African cassava mosaic Malawi virus* – EACMMV, *East African cassava mosaic Zanzibar virus* – EACMZV, *South African cassava mosaic virus* – SaCMV, *Indian cassava mosaic virus* – ICMV, *Sri Lankan cassava mosaic virus* – SLCMV (LEGG e FAUQUET 2004; BULL et al., 2006) ainda não relatados nas Américas (Figura 2) apesar da presença do inseto vetor (HERRERA CAMPO et al., 2011). Transmitida pela mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B e por material vegetativo infectado (DE BRUYN et al., 2012), o CMD é caracterizado por sintomas típicos de mosaico (STOREY e NICHOLS, 1938) apesar de variações por fatores ambientais (GIBSON, 1994) com acentuada diminuição do crescimento e a produção da planta (THRESH et al., 1994) (Figura 3).

A utilização de plantas resistentes é uma estratégia em longo prazo que minimiza os efeitos do ataque de patógenos. Variedades resistentes ao CMD, por exemplo, manifestam os sintomas com menor gravidade quando comparadas às suscetíveis (OKOGBENIN et al., 2007; RIBEIRO et al., 2012). Ainda no que se diz a respeito ao mosaico africano, as condições favoráveis ao estabelecimento da virose no Brasil (HERRERA CAMPO et al., 2011) e restrições quarentenárias impedem a seleção de genótipos resistentes na presença do patógeno no país. No entanto, existem marcas moleculares que flanqueiam os genes que conferem resistência ao patógeno, a exemplo do *CMD1* (FARGETTE et al., 1996), *CMD2* (AKANO et al., 2002) e *CMD3* (OKOGBENIN et al., 2012) tornando possível a seleção assistida na ausência do patógeno.

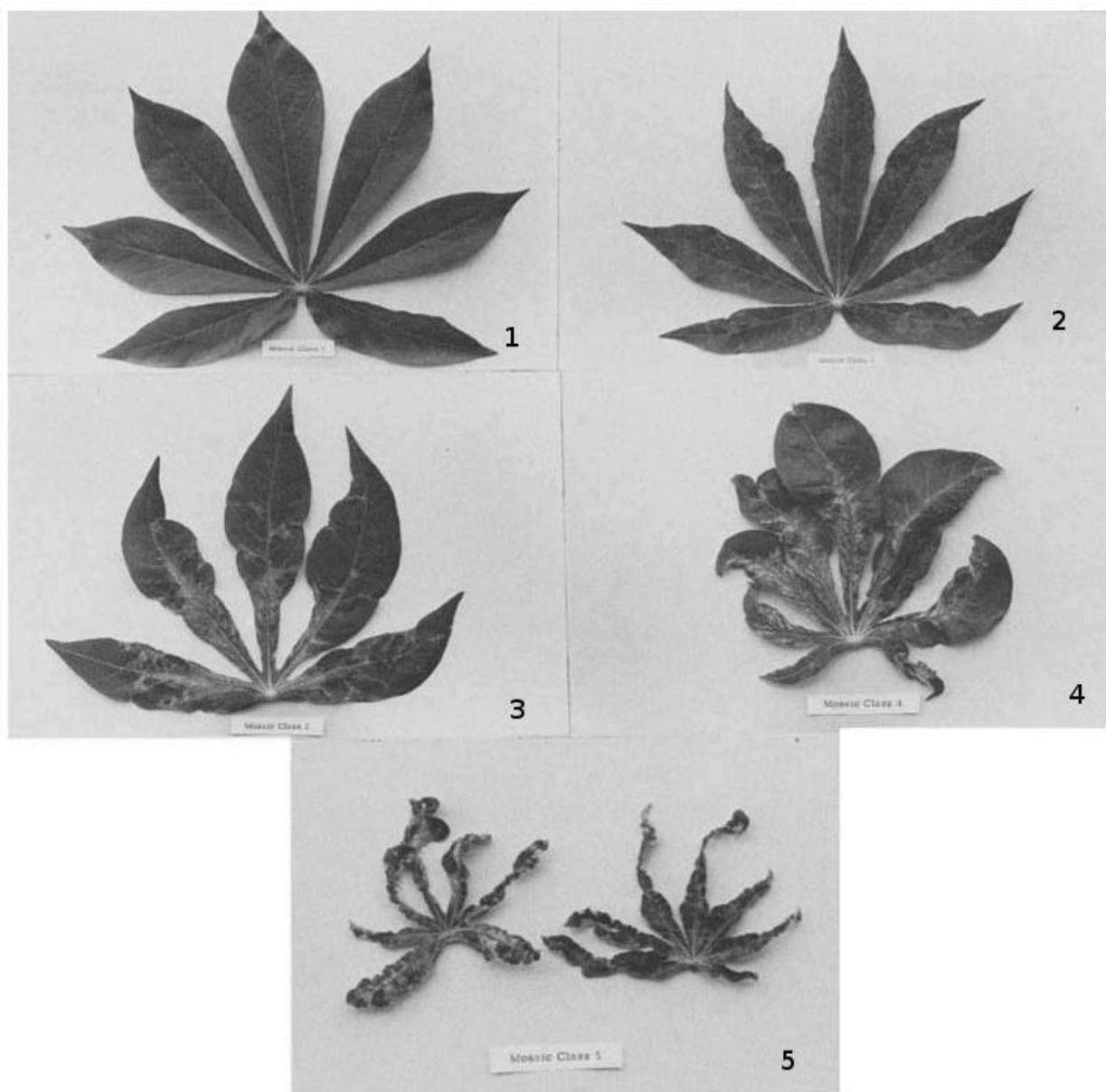
Em nível internacional, diversas fontes de resistência ao mosaico africano (*Cassava Mosaic Disease - CMD*) são mantidos pelo ITTA sob a denominação de série *Tropical Manihot Series* (TMS) derivadas do cruzamento entre variedades de *M. esculenta* e *Manihot Glaziovii* Muel (Arg.) (JENNINGS, 1976) e a série *Tropical Manihot Esculenta* (TME) que reúne diversas variedades locais de *M. esculenta*.

Desta forma, o trabalho teve como objetivo geral desenvolver novas ferramentas moleculares para detecção de polimorfismo molecular na cultura da mandioca e utilizar a seleção assistida por marcadores moleculares para identificar potenciais fontes de resistência ao vírus do mosaico africano.



**Figura 2:** Distribuição relatada e potencial do *Cassava Mosaic Disease* – CMD. **a)** Distribuição conhecida do vírus na África e Ásia; as cores representam: 1 – *African Cassava Mosaic Virus* (ACMV); 2. ACMV e *East African Cassava Mosaic Cameroon Virus* (EACMCV); 3 – ACMV e EACMV; 4 – ACMV e EACMV-UG; 5 – ACMV, EACMV-UG e *East African Cassava Mosaic Virus - 2 Uganda strain* (EACMV-UG2); 6 – ACMV, EACMV e EACMCV; 7 – ACMV, EACMV, EACMCV e EACMV-UG; 8 – ACMV, EACMV e EACMV-UG; 9 – ACMV, EACMV, EACMV-UG e EACMV-UG2; 10 – EACMV-UG; 11 – ACMV, EACMV, EACMV-UG e *South African Cassava Mosaic Virus* (SACMV); 12 – ACMV, EACMV, SACMV; 13 – EACMV; 14 – EACMV-UG2; 15 – EACMV-UG e EACMV-UG2; 16 – EACMV e SACMV; 17– SACMV; 18 – *SriLankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV); 19 – *Indian Cassava Mosaic Virus* (ICMV); 20 – SLCMV e ICMV. Mapas b, c e d mostram distribuição conhecida de grande extensão de: **b)** *African Cassava Mosaic Virus* (ACMV); **c)** *East African Cassava Mosaic Virus* (EACMV), **d)** *East African Cassava Mosaic Virus–Uganda strain* (EACMV-UG). **e)** distribuição potencial do CMD: valores são classificados em cinco categorias entre 50 e 100% conforme legenda.

**Fonte:** Herrera Campo et al. (2011).



**Figura 3:** Escala de severidade apresentando sintomas do mosaico africano de um (sem sintomas) a cinco (sintomas severos).

**Fonte:** Hahn et al. (1980).

## REFERÊNCIAS

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.

AKANO, A. O.; DIXON, A.; MBA, C.; BARRERA, E.; FREGENE, M. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.521-525, 2002.

ANDERSEN, J. R.; LUBBERSTEDT, T. Functional markers in plants. **Trends in Plant Science**, v.8, p.554-560, 2003.

ARAÚJO, J. C.; ALMEIDA, C. O. Inventário de variedades de mandioca lançadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura no período de 1996 a 2009. **Circular Técnica 107 CNPMF**, Cruz das Almas, 2013.

BANG, T. C. de; RAJI, A. A.; INGELBRECHT, I. L. A multiplex microsatellite marker kit for diversity assessment of large Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.29, p.655-662, 2011.

BLAIR, M.; FREGENE, M.; BEEBE, S.; CEBALLOS, H. Marker-assisted breeding in common beans and cassava. In: **Marker-assisted selection: Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish**. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, p.81-115, 2007.

BORGES, M. de F.; FUKUDA, W.M.G.; ROSSETTI, A.G. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p.1559-1565, 2002.

BULL, S. E.; BRIDDON, R. W.; SSERUBOMBWE, W. S.; NGUGI, K.; MARKHAM, P. G.; STANLEY, J. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. **Journal of General Virology**, v.87, p.3053-3065, 2006.

CALVERT, L. A.; CUERVO IBÁÑEZ, M; OSPINA, M. D.; FAUQUET, C. M.; RAMÍREZ, B. C. Characterization of cassava common mosaic virus and a defective RNA species **Journal of General Virology**, v.77, p.525-530, 1996.

CALVERT, L. A.; THRESH J. M. Virus and virus diseases of Cassava In: Hillocks, R. J. Thresh, J. M. Belloti, A. **Cassava biology and utilization**. CABI Publishing. p.237-260, 2002.

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

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

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.; KULAKOW, P.; HERSHEY, C. Cassava breeding: Current status, bottlenecks and the potential of biotechnology tools. **Tropical Plant Biology**, v.5, p.73-87, 2012.

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.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; MAYA, M. M.; TOHME, J.; DUQUE, M. C.; IGLESIAS, C.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; KOCHERT, G. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. **Molecular Breeding**, v.5, p.263-273, 1999.

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Programa de recursos Genéticos. Colección de Yuca. Disponível em: <<http://isa.ciat.cgiar.org/urg/cassavacollection.do>> Acesso em: Jul. 2014.

COLLARD, B. C.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.363, p.557-572, 2008.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.189-199, 2000.

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: 27 Ago. 2014.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de Mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.158-164, 2003.

DE BRUYN, A.; VILLEMOT, J.; LEFEUVRE, P.; VILLAR, E.; HOAREAU, M.; HARIMALALA, M.; ABDOUL-KARIME, A.L; ABDOU-CHAKOUR, C.; REYNAUD, B.; HARKINS, G.W.; VARSANI, A.; MARTIN, D. P.; LETT, J. East African cassava mosaic-like viruses from Africa to Indian ocean islands: molecular diversity, evolutionary history and geographical dissemination of a bipartite begomovirus. **Evolutionary Biology**, v.12, p.228, 2012.

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

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Portal Alelo Recursos Genéticos**. Disponível em: <<http://mwpin026.cenargen.embrapa.br:8080/portallalelo/index.php/portallalelo/colecoes/vegetal/raizes-e-tuberculos>> Acesso em: Jul. 2014.

**FAO** - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acesso em: Fev. 2014.

FARGETTE, D.; COLON, L.T.; BOUVEAU, R.; FAUQUET, C. Components of resistance of cassava to African cassava mosaic virus. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.645-654, 1996.

FELIPE, F. I.; ALVES, L.R.A.; VIEIRA, R.M. Fécula de mandioca. Produção na Tailândia versus Brasil. **Agroanalysis**, p.28, 2013.

FERGUSON, M. E.; HEARNE, S. J; CLOSE, T. J; WANAMAKER, S; MOSKAL, W. A; TOWN, C. D; DE YOUNG, J; MARRI, P. R; RABBI, I. Y. de; VILLIERS, E. P. Identification, validation and high-throughput genotyping of transcribed gene SNPs in cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, v.124, p.685-695, 2012.

FREGENE, M.; ANGEL, F.; GOMEZ, R.; RODRIGUEZ, F.; CHAVARRIAGA, P.; ROCA, W.; TOHME, J. BONIERBALE, M. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.431-441, 1997.

FREGENE, M.; BERNAL, A.; DUQUE, M.; DIXON, A.; TOHME, J. AFLP analysis of African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm resistant to the cassava mosaic disease (CMD). **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.678-685, 2000.

FUKUDA, W.M.G., CAVALCANTI, J.; FUKUDA, C.; COSTA, I.R.S. Variabilidade genética e melhoramento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) In: **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semiárido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov., 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/temas.html>> Acesso em: Fev. 2014.

GIBSON, R. W. Long-term absence of symptoms in heattreated African cassava mosaic geminivirus-infected resistant cassava plants. **Tropical Science**, v.34, p.154-158, 1994.

GRANER, E. A. Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca. **Bragantia**, v.2, p.1-12, 1942.

HAHN, S. K.; TERRY, E. R.; LEUSCHNER, K. Breeding cassava for resistance to cassava mosaic disease. **Euphytica**, v.29, p.673-683, 1980.

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



HU, J.; VICK, B. A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.21, p.289-294, 2003.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_%5Bmensal%5D/Comentarios/lspa\\_201407comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Comentarios/lspa_201407comentarios.pdf)> Acesso em Ag. 2014a.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo9.asp?e=c&p=LA&z=t&o=26>> Acesso em: Ago 2014b.

IITA - Instituto Internacional de Agricultura Tropical. **IITA Accessions 2. Cassava collection**. Disponível em: <<http://my.iita.org/accession2/collection.aspx?id=9>> Acesso em: Jul. 2014.

JENNINGS, D. L. Breeding for resistance to African cassava mosaic disease: progress and prospects. In: Interdisciplinary Workshop. IDRC, Muguga (Kenya), 1976.

LEGG, J. P.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant Molecular Biology**, v.56, p.585-599, 2004.

LOKKO, Y.; ANDERSON, J. V.; RUDD, S.; RAJI, A.; HORVATH, D.; MIKEL, M.A.; KIM, R.; LIU, L.; HERNANDEZ, A.; DIXON, A. G. O.; INGELBRECHT, I. L. Characterization of an 18,166 EST dataset for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) enriched for drought-responsive genes. **Plant Cell Reporter**, v.26, p.1605-1618, 2007.

MARMEY, P.; BEECHING, J.; HAMON, S.; CHARRIER, A. Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) germplasm using RAPD markers. **Euphytica**, v.74, p.203-209, 1994.

MBA, R.E.C.; STEPHENSON, P.; EDWARDS, K.; MELZER, S.; NKUMBIRA, J.; GULLBERG, U.; APEL, K.; GALE, M.; TOHME, J.; FREGENE, M. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.21-31, 2001.

MEZETTE, T. F.; BLUMER, C. G.; VEASEY, E. A. Morphological and molecular diversity among cassava genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.510-518, 2013.

MOURA, E. F.; FARIAS NETO, J. T. de.; SAMPAIO, J. E.; SILVA, D. T. da.; RAMALHO, G. F. Identification of duplicates of cassava accessions sampled on the North Region of Brazil using microsatellite markers. **Acta Amazonica**, v.43, p.461-468, 2013.

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

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=manihot+esculenta>> Acesso em: Ago. 2014.

OKOGBENIN, E.; EGESI, C. N.; OLASANMI, B.; OGUNDAPO, O.; KAHYA, S.; HURTADO, P.; MARIN, J.; AKINBO, O.; MBA, C.; GOMEZ, H.; DE VICENTE, C.; BAIYERI, S.; UGURU, M.; EWA, F.; FREGENE, M. Molecular marker analysis and validation of resistance to cassava mosaic disease in elite cassava genotypes in Nigeria. **Crop Science**, v.52, p.2576-2586, 2012.

OKOGBENIN, E.; MARIN, J.; FREGENE, M. An SSR-based molecular genetic map of cassava. **Euphytica**, v.147, p.433-440, 2006.

OKOGBENIN, E.; PORTO, M. C. M.; EGESI, C.; MBA, C.; OSPINOSA, E.; SANTOS, L. G.; OSPINA, C.; MARIN, J.; BARERA, E.; GUTIERREZ, J.; EKANAYAKE, I.; IGLESIAS, C.; FREGENE, M. Marker aided introgression of CMD resistance in Latin American germplasm for genetic improvement of cassava in Africa. **Crop Science**, v.47, p.1895-1904, 2007.

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

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

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; CARDOSO, E. M. R.; AÍOUQUERQUE, F. C. de; MEISSNER FILHO, P. E. J. Couro de sapo em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no Estado do Pará. **Comunicado Técnico Embrapa**, v.6, p.1-2, 1999.

PROCHNIK, S., MARRI, P. R., DESANY, B., RABINOWICZ, P. D., KODIRA, C., MOHIUDDIN, M., RODRIGUEZ, F., FAUQUET, C., TOHME, J., HARKINS, T., ROKHSAR, D. S., ROUNSLEY, S. The cassava genome: Current progress, future directions. **Tropical Plant Biology**, v.5, p.88–94, 2012.

QUEIRÓZ, M. A. Os recursos genéticos vegetais e os melhoristas de plantas In: **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semiárido/Brasília-DF: Embrapa Recursos

Genéticos e Biotecnologia, nov., 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/temas>>.html Acesso em: Fev. 2014.

RABBI, I. Y.; HAMBLIN M. T.; KUMAR, P. L.; GEDIL, M. A.; IKPAN, A. S.; JEAN-LUC JANNINK; KULAKOW, P. A. High-resolution mapping of resistance to cassava mosaic geminiviruses in cassava using genotyping-by-sequencing and its implications for breeding. **Virus Research**, v.186, p.87-96, 2014.

RAJI, A. A.; ANDERSON, J.V.; KOLADE, O. A.; UGWU, C. D.; DIXON, A. G. O.; INGELBRECHT, I. L. Gene-based microsatellites for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): prevalence, polymorphisms, and cross-taxa utility. **Plant Biology**, v.9, p.1-11, 2009.

RIBEIRO, P. F.; AKROMAH, R.; MANU-ADUENING, J. Using marker assisted selection to hasten screening of cassava cultivars developed through introgression of Cassava Mosaic Disease (CMD) resistance into cassava landraces in Ghana. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.2, p.74-80, 2012.

ROA, A. C.; MAYA, M. M.; DUQUE, M.C.; TOHME. J.; ALLEM, A. C.; BONIERBALE, M. W. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. **Theoretical and Applied Genetics**,.95, p.741-750, 1997.

ROGERS, D. J. Some botanical and ethnological considerations of *Manihot esculenta* **Economic Botany**, v.19, p.369-377, 1965.

SANTANA, A C. de (COORD.); CARVALHO, D. F.; MENDES, F. A. T.; FILGUEIRAS, G. C.; BOTELHO, M. DO N.; KITABAYASHI, R. T. **Identificação e caracterização de arranjos produtivos locais nos Estados do Pará e do Amapá, no período 2000 a 2005: orientações para políticas de desenvolvimento local**. Belém: UNAMA, p. 171, 2010.

SARDOS, J.; MCKEY, D.; DUVAL, M. F.; MALAPA, R.; NOYER, J. L.; LEBOT, V. Evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) after recent introduction into a South Pacific Island system: the contribution of sex to the diversification of a clonally propagated crop. **Genome**, v.51, p.912-921, 2008.

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

SILVA, R.M. DA; BANDEL, G.; FARALDO, M.I.F.; MARTINS, P.S. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. **Scientia Agricola**, v.58, p.101-107, 2001.

SIQUEIRA, M. V. B. M.; QUEIROZ-SILVA, J. R.; BRESSAN, E. A.; BORGES, A.; PEREIRA, K. J. C.; PINTO J G.; VEASEY, E. A. Genetic characterization of cassava

(*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.104-110, 2009.

STOREY, H. H.; NICHOLS, R. F. W. Studies of the Mosaic Diseases of Cassava. **Annals of Applied Biology**, v.25, p.790-806, 1938.

TANGPHATSORNRUANG, S.; SRAPHET, S.; SINGH, R.; OKOGBENIN, E.; FREGENE, M.; TRIWITAYAKORN, K. Development of polymorphic markers from expressed sequence tags of *Manihot esculenta* Crantz. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.682-685, 2008.

THRESH, J. M.; FARGETTE, D.; OTIRN-NAPE, G. W. Effects of African cassava mosaic geminivirus on the yield of cassava. **Tropical Science**, v.34, p.26-42, 1994.

TIENDRÉBÉOGO, F.; PIERRE LEFEUVRE, P.; HOAREAU, M.; HARIMALALA, M. A.; DE BRUYN, A.; VILLEMOT, J.; TRAORÉ, V. S. E.; KONATÉ, G.; TRAORÉ, A. S.; NICOLAS BARRO, N.; REYNAUD, B.; TRAORÉ, O.; LETT, J. M. Evolution of African cassava mosaic virus by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. **Virology Journal**, v.9, p.67, 2012.

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

WHANKAEW, S.; POOPEAR, S.; KANJANAWATTANAWONG, S.; TANGPHATSORNRUANG, S.; BOONSENG, O.; LIGHTFOOT, D. A.; TRIWITAYAKORN, K. A genome scan for quantitative trait loci affecting cyanogenic potential of cassava root in an outbred population. **BMC Genomics**, v.12, p.266, 2011.

ZACARIAS, A. M.; BOTHA, A. M.; LABUSCHAGNE, M. T.; BENESI, I. R. M. Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm from Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica**, v.138, p.49-53, 2004.

ZOU, M.; XIA, Z.; LING, P.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; WEI, Z.; BO, W.; WANG, W. Mining EST-Derived SSR markers to assess genetic diversity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Molecular Biology**, v.29, p.961-971, 2011.

## CAPÍTULO 1

### **DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) COMO NOVA FERRAMENTA MOLECULAR PARA ANÁLISES GENÉTICAS NA CULTURA DA MANDIOCA<sup>3</sup>**

---

<sup>3</sup>O artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico Plant Molecular Biology Reporter

## DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) COMO NOVA FERRAMENTA MOLECULAR PARA ANÁLISES GENÉTICAS NA CULTURA DA MANDIOCA

**Resumo** - A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) carece de estudos moleculares para uso no melhoramento genético e na manutenção de bancos de germoplasma. Neste trabalho, objetivou-se desenvolver e validar iniciadores do tipo TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) para a mandioca bem como analisar o seu potencial de estruturação da diversidade genética da espécie. Inicialmente foram avaliadas 396 combinações (99 iniciadores fixos versus quatro arbitrários) com 64% das combinações apresentando bom padrão de amplificação e polimorfismo. As 69 combinações TRAP mais polimórficas foram utilizadas na caracterização de 46 genótipos de mandioca, na qual foram identificados 606 alelos (variação de 3 a 18, com média de 8,8 alelos por combinação). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,03 a 0,38 (média de 0,23), embora 31 combinações apresentem  $PIC > 0,25$ . A capacidade de resolução dos marcadores ( $R_p$ ) variou de 0,10 a 6,30 (média de 3,21). Observou-se que os iniciadores relacionados à biossíntese de amido, carotenoides, compostos cianogênicos, deterioração fisiológica pós-colheita, formação de raízes tuberosas e respostas de defesa foram os mais polimórficos (>70% de fragmentos polimórficos,  $PIC > 0,25$  e  $R_p > 3,21$ ). Foram identificados 37 alelos privados em 20 genótipos. O agrupamento realizado com base em inferência Bayesiana (*STRUCTURE*) revelou a presença de dois grupos principais ( $K=2$ ) e quatro subgrupos ( $K=4$ ). A diferenciação dos agrupamentos pela análise de variância molecular (AMOVA) evidenciou que a maior parte da variação genética está dentro dos grupos, porém com uma diferença significativa entre os grupos ( $\Phi_{PT} = 0,139$  para  $K=2$  e  $0,138$  para  $K=4$ ). Portanto, os iniciadores TRAP, possuem um alto polimorfismo para serem utilizados como ferramenta molecular na cultura da mandioca, além da associação com regiões gênicas que podem aumentar as chances de obtenção de marcas funcionais.

**Palavras chaves:** sequências expressas, variabilidade genética, *Manihot esculenta* Crantz, marcador molecular.

## DEVELOPMENT OF TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) AS NEW TOOL FOR MOLECULAR GENETIC ANALYSIS IN CASSAVA

**Abstract** - Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) lacks molecular studies to be used in breeding and germplasm banks maintenance. This work aimed to develop and validate TRAP markers (Target Region Amplification Polymorphism) for cassava and evaluate its potential for structuring the genetic diversity of this specie. Preliminary analyzes with 396 combinations (99 fixed versus 4 arbitrary primers), showed 64% of combinations with good amplification pattern and polymorphism. The 69 most polymorphic TRAP combinations were used for characterizing 46 cassava genotypes, in which 606 alleles (range 3-18, with a mean of 8.8 alleles per combination) were identified. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0.03 to 0.38 (average 0.23), while 31 combinations showed PIC > 0.25. The resolving power (Rp) parameter ranged from 0.10 to 6.30 (average 3.21). It was observed that the primers related to the starch and carotenoids biosynthesis, cyanogenic compounds, post-harvest physiological deterioration, root formation and defense responses were the most polymorphic (> 70% of polymorphic fragments, PIC > 0.25 and Rp > 3.21). 37 private alleles were identified in 20 accessions. Bayesian clustering as implemented in STRUCTURE revealed the presence of two major clusters (K = 2) and four sub cluster (K = 4). The group differentiation based on molecular variance analysis (AMOVA) showed that most of the genetic variation is within groups, but with a significant difference between groups (PhiPT = 0.139 to K = 2 and 0.138 to K = 4) Therefore, TRAP primers have a high polymorphism to be used as a molecular tool in cassava, besides the association with genetic regions that may increase the chances in obtaining functional markers.

**Key words:** Molecular marker, Genetic diversity, Cassava, Expressed Sequence.

## INTRODUÇÃO

De acordo com dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO 2014) mais de 67% da produção mundial (186 milhões de toneladas) de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) está concentrada em oito países: Nigéria (54 milhões de toneladas), Tailândia (30,2 milhões de toneladas), Indonésia (23,9 milhões de toneladas), Brasil (21,2 milhões de toneladas), República Democrática do Congo (16,5 milhões de toneladas), Angola (16,4 milhões), Gana (14,5 milhões), e Moçambique (10 milhões). Isto demonstra que embora a mandioca seja uma espécie nativa da região amazônica brasileira, seu cultivo se expandiu pelo mundo, sendo alimento básico para mais de 500 milhões de pessoas. Nos últimos 10 anos (2003 a 2013) houve um crescente aumento na produtividade média da cultura a nível mundial (de 10,76 a 13,91 t ha<sup>-1</sup>) enquanto a produtividade brasileira continuou estável oscilando de 13,44 a 14,52 t ha<sup>-1</sup> (FAO 2014). Diversos fatores ainda contribuem para esta baixa produtividade, a exemplo do uso de técnicas de cultivo inadequadas e uso de variedades com reduzido potencial de produção. Por outro lado, como centro de origem (Olsen e Schaal 2001), o Brasil possui centenas de variedades locais que podem ser utilizadas para geração de novas variedades com características agrônômicas mais interessantes para sistemas de cultivo mais produtivos.

Nos últimos anos, avanços metodológicos importantes têm sido obtidos por meio da análise de polimorfismos de DNA, como técnica auxiliar aos programas de melhoramento genético. Atualmente, os esforços estão voltados para o entendimento das relações entre genótipo e fenótipo, para que a seleção genética seja feita de forma mais rápida e eficiente. De modo geral, observa-se um grande avanço no conhecimento sobre a genética e melhoramento da cultura da mandioca, com base no desenvolvimento de novos recursos computacionais, modelos estatísticos e na própria genética quantitativa e molecular. Entretanto, é preciso avançar em duas áreas estratégicas para garantir avanços mais significativos no melhoramento da mandioca, i.e., 1) seleção baseada no genótipo dos indivíduos e 2) avaliação precoce e acurada das características de maior importância agrônômica.

Em ambas as estratégias, os marcadores de DNA podem ser bastante úteis, seja na identificação de genótipos com características específicas (Aiemmaka et al. 2012), busca e associação de regiões genômicas a fenótipos de interesse de forma a permitir a aplicação da seleção assistida por marcadores (Blair et al. 2007),



melhoria da acurácia da avaliação genética ao incorporar dados de parentesco mais compreensivo e acurado (Rodríguez-Ramilo et al. 2007; Gowda et al. 2014), além de permitir a eliminação de alelos recessivos deletérios em populações de melhoramento.

Os marcadores moleculares também permitem mensurar o polimorfismo de um grande número de locos sem influência ambiental e com alto poder de discriminação. Por isso, diversos tipos de marcadores têm sido utilizados na cultura da mandioca, para auxiliar nos estudos de diversidade genética, filogenia, construção de mapas de ligação e mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*), a exemplo de RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Beeching et al. 1993), RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* (Marmey et al. 1993; Fregene et al. 1997; Zacarias et al. 2004; Akinbo et al. 2007), AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Roa et al. 1997; Elias et al. 2000; Fregene et al. 2000; Chen et al. 2010; Kunkeaw et al. 2010), DArT - *Diversity Array Technology* (Xia et al. 2005), microssatélites (Fregene et al. 2003; Hurtado et al. 2008; Kunkeaw et al. 2010; Asare et al. 2011; Mezette et al. 2013; Pariyo et al. 2013) e SNP - *Single Nucleotide Polymorphisms* (Olsen 2004; Kawuki et al. 2009). Porém, a maioria destes marcadores está associada à *loci* aleatórios no genoma da mandioca, sem associação específica a regiões gênicas de interesse agrônômico. Recentemente alguns marcadores moleculares foram desenvolvidos a partir de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), a exemplo de microssatélites (Lokko et al. 2007; Raji et al. 2009a; Sraphet et al. 2011; Zou et al. 2011; Kunkeaw et al. 2011), SNP (Ferguson et al. 2012), ou combinação de ambos (Rabbi et al. 2012).

O uso de marcadores genômicos aleatórios contribui para elucidar baixas associações existentes entre genótipo e fenótipo, por isso, é preciso investir cada vez mais em marcadores associados a regiões expressas para melhorar a acurácia na predição de fenótipos. A técnica TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), utiliza informações de genes candidatos para gerar marcadores polimórficos (Hu e Vick 2003), de modo a potencializar a busca por marcas associadas a características de interesse. Além da análise do polimorfismo de regiões gênicas, a técnica de TRAP traz como vantagem a capacidade de produzir perfil de amplificação com muitas bandas por gel, o que diminui o custo por informação de polimorfismo.

TRAP tem sido utilizada com eficiência na detecção de diversidade em cana-de-açúcar (Alwala et al. 2006a; 2006b), *Vicia faba* L. (Kwon et al. 2010), *Triticum aestivum* L. (Barakat et al. 2013) e *Diospyros kaki* Thunb. (Lou et al. 2013). Também há relatos de sucesso no mapeamento genético de *Helianthus annuus* L. (Chen et al. 2006), trigo (Menzo et al. 2013) e *fingerprinting* molecular em *Spinacia oleracea* L. (Hu et al. 2007). Por outro lado, mesmo com o desenvolvimento de um grande número de ESTs na cultura da mandioca (Lopez et al. 2004; Lokko et al. 2007; Sakurai et al. 2007), relatos do uso da técnica TRAP são raros. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de detecção de polimorfismo em regiões gênicas na cultura da mandioca com uso de marcadores do tipo TRAP bem como avaliar seu potencial para estruturação genética.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Material vegetal e extração de DNA***

Dezesseis variedades melhoradas e 30 acessos de germoplasma pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, Brasil), procedentes de vários ecossistemas do Brasil e Colômbia foram utilizados para a análise do polimorfismo dos marcadores TRAP (Tabela 1).

O DNA genômico foi extraído segundo protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) 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  $\lambda$  (Lambda).

### ***Desenho e otimização dos iniciadores TRAP***

Foram selecionadas 99 sequências ESTs envolvidas em diversos processos metabólicos na cultura da mandioca, como deterioração fisiológica pós-colheita, respostas ao ataque de patógenos e estresses abióticos (seca), proteção contra o estresse oxidativo, metabolismo de glicose e nitrogênio, formação de raízes tuberosas, biossíntese de carotenoides, compostos cianogênicos e amido (Tabela 2).

**Tabela 1:** Relação do conjunto de 46 genótipos de mandioca (variedades melhoradas e acessos) utilizados para a análise do polimorfismo dos marcadores *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP.

| Genótipo | Forma de obtenção* | Local de origem | Genótipo        | Forma de obtenção | Local de origem |
|----------|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| 96207-05 | ME                 | Brasil – BA     | BGM1116         | VL                | Brasil – BA     |
| 9624-09  | ME                 | Brasil – BA     | BGM1179         | VL                | Brasil – PE     |
| 98150-06 | ME                 | Brasil – BA     | BGM1289         | VL                | Brasil – PE     |
| 9975-01  | ME                 | Brasil – BA     | BGM1290         | VL                | Brasil – PE     |
| BGM0004  | VL                 | Brasil – BA     | BGM1291         | VL                | Brasil – PE     |
| BGM0005  | VL                 | Brasil – MG     | BGM1292         | VL                | Brasil – PE     |
| BGM0006  | VL                 | Brasil – MG     | BGM1318         | VL                | Brasil – PE     |
| BGM0007  | VL                 | Brasil – BA     | BGM1341         | VL                | Brasil – PE     |
| BGM0014  | ME                 | Brasil – BA     | BGM1632         | VL                | Brasil – PR     |
| BGM0019  | VL                 | Brasil – PA     | BGM1633         | VL                | Brasil – CE     |
| BGM0028  | VL                 | Brasil – BA     | BGM1660         | VL                | Brasil – BA     |
| BGM0032  | VL                 | Brasil – RN     | BGM1728         | ME                | Brasil – BA     |
| BGM0036  | VL                 | Brasil – BA     | BGM1810         | ME                | Brasil – BA     |
| BGM0048  | VL                 | Brasil – BA     | BGM2020         | VL                | Brasil – PR     |
| BGM0050  | VL                 | Brasil – BA     | BGM2038         | VL                | Brasil – BA     |
| BGM0054  | VL                 | Brasil – PA     | BGM2041         | ME                | Brasil – BA     |
| BGM0060  | VL                 | Brasil - AM     | BGM2043         | ME                | Brasil – BA     |
| BGM0062  | VL                 | Brasil – BA     | BGM2050         | ME                | Colômbia        |
| BGM0066  | VL                 | Brasil – PA     | BGM2052         | VL                | Brasil – PR     |
| BGM0100  | ME                 | Brasil – BA     | BRS Caipira     | ME                | Brasil – BA     |
| BGM0116  | VL                 | Brasil – BA     | BRS Formosa     | ME                | Brasil – BA     |
| BGM0289  | ME                 | Colômbia        | BRS Tapioqueira | ME                | Brasil – BA     |
| BGM0982  | VL                 | Brasil – AM     | BRS Verdinha    | ME                | Brasil – BA     |

\*VL = Variedade local; ME = genótipo resultante de melhoramento.

**Fonte:** Dados de passaporte da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

**Tabela 2.** Relação de 99 genes e iniciadores fixos utilizados na técnica *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP, para análise genética em mandioca.

| Número no GenBank | Gene/processo                                  | Processo biológico                                      | Iniciador | Sequência           |
|-------------------|--|---|-----------|---------------------|
| AY036011.1        | Phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1)           | Deterioração fisiológica pós-colheita                   | Trap-01   | gggaagaactcgggtgta  |
| EF645824.1        | Secretory peroxidase (PX3)                     | Resposta de defesa XAM                                  | Trap-02   | ccaaactgacatgattgc  |
| EU000298.1        | S-adenosyl-L-methionine synthetase             | Estresse oxidativo e balanço de nutrientes              | Trap-03   | ccttggtgagacctgat   |
| EU025132.1        | Aldo/keto reductase (AKR)                      | Biossíntese, metabolismo intermediário e desintoxicação | Trap-04   | gagattctctgggcaag   |
| EF568373.1        | Neoxanthin synthase (NXS)                      | Biossíntese de carotenoides                             | Trap-05   | ccatatgggaaatgaacc  |
| EF568374.1        | Phytoene desaturase (PDS)                      | Biossíntese de carotenoides                             | Trap-06   | ctgatcagagcaaagcaa  |
| EF568375.1        | Beta-carotene hydroxylase 2 (HYB)              | Biossíntese de carotenoides                             | Trap-07   | agagaagggtccggttgag |
| EF568376.1        | lycopene beta-cyclase (LYCB)                   | Biossíntese de carotenoides                             | Trap-08   | tgcccttttcttcagatag |
| EF667960.1        | Starch synthase isoform I (SSI)                | Biossíntese de amido                                    | Trap-09   | ctggtctggagaagcagt  |
| EF667961.1        | Starch synthase isoform II (SSII)              | Biossíntese de amido                                    | Trap-10   | gtaaggggccaatagatg  |
| EU002241.1        | NADH-plastoquinone oxidoreductase sub 5 (NDHF) | Proteção contra o estresse oxidativo                    | Trap-11   | tggttcttatgggtggtt  |
| EU249997.1        | Catalase-like (CAT1)                           | Sistema de defesa para eliminação de radicais           | Trap-12   | tcggtgttcacacctta   |
| X77012.1          | Starch branching enzyme (SBE)                  | Biossíntese de amido                                    | Trap-13   | ggctttatcactgggaag  |
| EU606022.1        | Homogentisate phytyltransferase (VTE2)         | Estresses abióticos                                     | Trap-14   | atctcccacacttgag    |
| EU736096.1        | Phytoene synthase                              | Biossíntese de carotenoides                             | Trap-15   | gttcttaacgaggcagag  |
| EU736097.1        | Carotenoid isomerase                           | Biossíntese de carotenoides                             | Trap-16   | gatgggataccttggaa   |
| AY101376.1        | Allergenic-related protein Pt2L4 (C1)          | Formação de raízes tuberosas                            | Trap-17   | aatgggaactcaccacat  |
| U95298.1          | Linamarase (pLIN-GEN)                          | Compostos cianogênicos                                  | Trap-18   | aacctaaagataccccaag |
| S35175.1          | Linamarase=beta-glucosidase                    | Compostos cianogênicos                                  | Trap-19   | aggatccaagaaatcg    |
| FJ688171.1        | Glutamic acid-rich protein (Pt2L4)             | Formação de raízes tuberosas                            | Trap-20   | tggtactgctgaggtaa   |
| GU111723.1        | Phytoene synthase 2 (PSY2)                     | Biossíntese de carotenoides                             | Trap-21   | ggcagagaaaggagtgc   |

Tabela 2. Cont...

| <b>Número no GenBank</b> | <b>Gene/processo</b>                             | <b>Processo biológico</b>   | <b>Iniciador</b> | <b>Sequência</b>      |
|--------------------------|--|-----------------------------|------------------|-----------------------|
| FN551838.1               | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) | Metabolismo de glicose      | Trap-22          | tcagataatgcaggatgc    |
| FN551942.1               | Nitrate reductase                                | Metabolismo de nitrogênio   | Trap-23          | cttcactcctgcaattt     |
| AY188523.1               | NBS-LRR resistance protein (RGH1)                | Resposta de defesa          | Trap-24          | ggctttcatttctcacatc   |
| AY188524.1               | NBS-LRR resistance protein (RGH2)                | Resposta de defesa          | Trap-25          | ggctttcatttctcacatc   |
| AY187301.1               | RCa11  | Sinal de transdução         | Trap-26          | gagggaaagaaattgtgc    |
| GQ922215.1               | Sucrose phosphatase (SPP)                        | Metabolismo de glicose      | Trap-27          | gttccttgagaggtggag    |
| GU229751.1               | Isoamylase (Meisa1)                              | Metabolismo de carboidratos | Trap-28          | ggggaagacaacaatgat    |
| HM038439.1               | Granule-bound starch synthase I (GBSSI)          | Biossíntese de amido        | Trap-29          | gcttctccactcctacaa    |
| HM046981.1               | Granule-bound starch synthase II (GBSSII)        | Biossíntese de amido        | Trap-30          | agaggtaaataactactgtca |
| HM046985.1               | Glucan water dikinase (GWD)                      | Metabolismo de ATP          | Trap-31          | tggaaggacgactaaggta   |
| HM046987.1               | Starch branching enzyme I (SBEI)                 | Biossíntese de amido        | Trap-32          | atcttgagtgcccttggtg   |
| HM485466.1               | Granule-bound starch synthase (GBSSI)            | Biossíntese de amido        | Trap-33          | aaatctccactccaccac    |
| AY271880.1               | NBS type resistance protein (RCa10.7)            | Resposta de defesa          | Trap-34          | caggacttggaggatttc    |
| AY271882.1               | NBS type resistance protein (RCa4.1)             | Resposta de defesa          | Trap-35          | gtcttccattggctcttc    |
| AY271884.1               | NBS type resistance protein (RCa6.2)             | Resposta de defesa          | Trap-36          | aaatgctgaggagttcct    |
| AY271887.1               | NBS type resistance protein (RCa6.5)             | Resposta de defesa          | Trap-37          | tgtggagttcctcttgct    |
| AY271890.1               | TIR type resistance protein (RCa12.3)            | Sinal de transdução         | Trap-38          | ggagaggagatcactcca    |
| GU120072.1               | Phytoene desaturase (PDS)                        | Biossíntese de carotenoides | Trap-39          | tgacgactggaaagagatt   |
| GU120073.1               | Zeta-carotene desaturase (ZDS)                   | Biossíntese de carotenoides | Trap-40          | cccgtgtatgctcactat    |
| GU120074.1               | lycopene beta-cyclase (bLCY)                     | Biossíntese de carotenoides | Trap-41          | tctgtagaagccttcag     |
| GU120075.1               | lycopene epsilon-cyclase (eLCY)                  | Biossíntese de carotenoides | Trap-42          | acattcatcacctgttc     |
| GU120076.1               | beta-carotene hydroxylase (bHYD)                 | Biossíntese de carotenoides | Trap-43          | cagagaaggccatttgag    |
| GU120077.1               | Carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1)         | Biossíntese de carotenoides | Trap-44          | cagtgaatgtgattgatgc   |

Tabela 2. Cont...

| Número no GenBank | Gene/processo                                    | Processo biológico  | Iniciador | Sequência            |
|-------------------|--|---|-----------|----------------------|
| GU120078.1        | Carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CCD4)         | Biossíntese de carotenoides                                   | Trap-45   | ggtggaaaaggtgagaata  |
| AF078690.1        | Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)                | Resposta de defesa XAM  | Trap-46   | gcttcaattgggaaactc   |
| AF078691.1        | Peroxidase                                       | Resposta de defesa XAM  | Trap-47   | gtgaagaaagggagatgg   |
| AY217353.1        | Glutamic acid-rich protein (c54)                 | Formação de raízes tuberosas                                  | Trap-48   | caaatccaagattcctc    |
| X74160.1          | Granule-bound starch synthase                    | Biossíntese de amido  | Trap-49   | atatacgtaacgcgcaga   |
| X77462.1          | UTP-glucose glucosyltransferase (CGT5)           | Biossíntese, regulação hormonal, sinalização e desintoxicação | Trap-50   | ggtcggagagatcactgt   |
| X77464.1          | UTP-glucose glucosyltransferase (CGT7)           | Biossíntese, regulação hormonal, sinalização e desintoxicação | Trap-51   | tccaagagcttactgag    |
| AY787210.1        | Alpha-hydroxynitrile lyase (HNL)                 | Compostos cianogênicos  | Trap-52   | atttgaccgatcaagac    |
| AF136149.1        | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (g3pdh) | Metabolismo de glicose  | Trap-53   | atgatgtggtgtccactg   |
| AY944583.1        | Alpha-amylase (AmyA)                             | Metabolismo de amido  | Trap-54   | tcagtcagaagagaatttgg |
| AY944584.1        | Beta-amylase (AmyB)                              | Metabolismo de amido  | Trap-55   | ggctttgtacaaggacat   |
| DN740350.1        | Gamma adaptin                                    | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-56   | aatacgtgctgcaaaact   |
| DN740355.1        | Cytochrome P450 CYP79D1a                         | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-57   | tgtttacatccacaacca   |
| DN740363.1        | ROS turnover Aldo/keto reductase (MecAKR)        | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-58   | aggtctgtctgaggctct   |
| DN740364.1        | PCD Cysteine protease (MecCP1)                   | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-59   | gaaggaatcaacaagatcg  |
| DN740366.1        | UDP glycosyltransferase                          | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-60   | gctccttcattgacctta   |
| DN740367.1        | ROS turnover Secretory peroxidase (MecPX3)       | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-61   | tatcaggtgcacacacact  |
| DN740369.1        | Immunophilin                                     | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-62   | agaagaggtgaagatgctg  |
| DN740370.1        | Unknown protein                                  | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-63   | gagatgcctcaaggatag   |
| DN740371.1        | Ion water or metabolite transport (PIP1)         | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-64   | gcagagtttattgcccact  |
| DN740373.1        | ROS turnover Ascorbate peroxidase (MecAPX2)      | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-65   | cttctccaggtgctctt    |
| DN740374.1        | Elongation factor (eF1aa)                        | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-66   | ttttgaagctggtatttcc  |
| DN740377.1        | PCD Class IV chitinase                           | Deterioração fisiológica pós-colheita                         | Trap-67   | ggtaatctcaatgctgag   |

Tabela 2. Cont...

| Número no GenBank | Gene/processo                                       | Processo biológico                    | Iniciador | Sequência           |
|-------------------|---|---------------------------------------|-----------|---------------------|
| DN740379.1        | Germin-like protein (MecGLP)                        | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-68   | acaccagacctcttc     |
| DN740380.1        | Auxin (ARP1)  | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-69   | aatgttatcacggctgatt |
| DN740382.1        | PWWP domain protein                                 | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-70   | gatcatgggtgatgatt   |
| DN740383.1        | PPD down-regulated genes Expressed protein          | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-71   | agcatcccactacaaggta |
| AF101233.1        | ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase               | Fotossíntese                          | Trap-72   | tgcttgtagcttatcc    |
| AF173900.1        | Granule bound starch synthase II precursor (GBSSII) | Biossíntese de amido                  | Trap-73   | tagtaagggggccaatag  |
| AF140613.1        | N-hydroxylating cytochrome P450 (CYP79D1)           | Compostos cianogênicos                | Trap-74   | caacgtcacctgaaaga   |
| DQ011041.1        | Alpha-amylase 2 (amy2)                              | Metabolismo de amido                  | Trap-75   | taactccatcatgacca   |
| DQ071875.1        | Plastid ATP/ADP transport protein 1 (AATP1)         | Componente de membrana                | Trap-76   | tcaggtgaaacgtctgaa  |
| DQ071876.1        | Plastid ATP/ADP transport protein 2 (AATP2)         | Componente de membrana                | Trap-77   | aagggtgatgcctgaat   |
| DQ071877.1        | Plastid ATP/ADP transport protein 2 (AATP2)         | Componente de membrana                | Trap-78   | tctctggatacccagtc   |
| DQ138370.1        | Neutral/alkaline invertase (nINV1)                  | Desconhecido                          | Trap-79   | gagacaaacaagcaagca  |
| DQ138373.1        | Sucrose transporter type 2 (SUT2)                   | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-80   | taggaaggtaagggttg   |
| DT883566.1        | Hydroxyproline-rich glycoprotein                    | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-81   | gattcgaagtgaggtgtt  |
| DT883569.1        | Xyloglucan endotransglycosylase                     | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-82   | gggagggactagtgaagac |
| DT883571.1        | ATP/ADP translocase precursor                       | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-83   | ttgatgggtctgtatct   |
| DT883572.1        | L-asparaginase                                      | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-84   | atgaacggtctccaatc   |
| DT883575.1        | Arginine decarboxylase                              | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-85   | gggaagattgacaattca  |
| DT883577.1        | ROS turnover Catalase (CAT1)                        | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-86   | aggaggagaagcagaagat |
| DT883579.1        | ROS turnover Thioredoxin-like protein               | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-87   | atagcgtcaatggactgt  |
| DT883581.1        | ROS turnover Metallothionein                        | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-88   | cctgaatggctgtttat   |
| DT883582.1        | ROS turnover Quinone-oxidoreductase                 | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-89   | acaatccatgtcttcgact |
| DT883583.1        | ROS turnover Early light induced proteina           | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-90   | ctatgtttgggtttgt    |
| DT883584.1        | Stress response Dehydrin                            | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-91   | atcatccaaaaacagagga |

Tabela 2: Cont...

| <b>Número no GenBank</b> | <b>Gene/processo</b>                           | <b>Processo biológico</b>             | <b>Iniciador</b> | <b>Sequência</b>    |
|--------------------------|--|---------------------------------------|------------------|---------------------|
| DT883585.1               | Stress response Heat shock protein 70 cognatea | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-92          | atcttctgatgccacact  |
| DT883586.1               | Ribosomal protein L5a                          | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-93          | cccaaaatattggagctta |
| DT883592.1               | Initiation factor (eIF4a)                      | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-94          | ggatgatattggcattgat |
| DT883593.1               | Putative endopeptidase                         | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-95          | ttggataggcttttcaac  |
| DT883595.1               | Unknown protein                                | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-96          | atcgatattgggagatcaa |
| DT883596.1               | Unknown protein                                | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-97          | tgatattgcctgatgatga |
| DT883601.1               | Unknown protein                                | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-98          | tttgggatttacgagag   |
| DT883602.1               | Unknown protein                                | Deterioração fisiológica pós-colheita | Trap-99          | ttggttaattgctgttga  |



As sequências foram obtidas no banco de dados NCBI - *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Os iniciadores foram desenhados com auxílio do software Primer3 (Rozen e Skaletsky 2000), dos quais apenas o iniciador direto foi utilizado como iniciador fixo. O tamanho ideal do iniciador foi definido como 18 nucleotídeos. Além disso, a T<sub>m</sub> ideal, mínima e máxima, foi ajustada para 56, 50 e 60 ° C, respectivamente. Como reverso, foram desenhados quatro iniciadores arbitrários conforme Li e Quiros (2001) adaptados por Hu e Vick (2003) (Tabela 3). Os iniciadores arbitrários compreendem três nucleotídeos seletivos na extremidade 3', quatro nucleotídeos ricos em sequências AT (corresponde a regiões de íntrons) ou GC (corresponde a regiões de éxons) na região central e 11 nucleotídeos aleatórios na extremidade 5'.

Inicialmente, todas as 396 combinações de iniciadores TRAP foram avaliadas na variedade melhorada BRS Verdinha e nos acessos BGM1116, BGM2043 e BGM0212, com intuito de selecionar as combinações com bom padrão de visualização das bandas e maior nível de polimorfismo. Em seguida, as combinações selecionadas foram utilizadas para análise do polimorfismo no conjunto de 46 genótipos de mandioca (Tabela 1).

**Tabela 3.** Relação dos quatro iniciadores arbitrários utilizados na validação de marcadores *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP em mandioca.

| Nome | Sequência de nucleotídeo (3'– 5') |
|------|-----------------------------------|
| Arb1 | attaattcgtacgcagtc                |
| Arb2 | gcaaattcgtacgcagtc                |
| Arb3 | gtcaattcgtacgcagtc                |
| Arb4 | tcaaattcgtacgcagtc                |

As reações de amplificação foram otimizadas em volume final de 15 µL, concentração do tampão de 1 X, 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Pluthero 1993); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP (Promega, USA); 0,2 uM dos iniciadores (IDT) e 10 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em esquema *touch-up* de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 2 min; 5 ciclos a 94 °C por 45 s, 35 °C por 45 s e 72° C por 1 min; seguidos por 30 ciclos

a 94 °C por 45 s, 40°C por 45 s, 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 7 min em termociclador modelo Veriti® 96-well (Applied Biosystems).

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1000 3% (Invitrogen, Carlsbad, CA), corado com brometo de etídeo (0,15 µg/mL) em tampão TBE 0,5 x (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA e q.s.p de água destilada) visualizados em Luz UV e registradas com o fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging, New Haven, USA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação visual com Ladder 50 pb (Ludwig Biotec, Alvorada, Brazil).

### **Discriminação dos marcadores TRAP**

Os produtos amplificados foram registrados em código binário (“1” presença; “0” ausência). Marcas monomórficas, pouco legíveis e/ou amplificados com mais de 10% de dados perdidos foram retiradas da análise.

A estimativa do poder de discriminação dos marcadores TRAP, foi estimada considerando as frequências relativas nos genótipos avaliados, com base no PIC (*Polymorphism information content*) que permite distinguir dois alelos tirados ao acaso da população. O PIC foi calculado de acordo com:  $PIC = 1 - \sum f_i^2$ , na qual  $f_i$  é a frequência do  $i^{\text{th}}$  alelo (Weir 1990). O poder de resolução (Rp) (Prevost e Wilkinson, 1999) dos marcadores TRAP foi calculado de acordo com a fórmula:  $Rp = \sum IB$ , em que  $IB$  refere-se à informatividade dos fragmentos, de acordo com  $1 - [2 \times (0.5 - p)]$ , em que  $p$  é a proporção de indivíduos que possuem o fragmento em análise.

### **Análise de agrupamento**

A estrutura dos 46 genótipos de mandioca foi avaliada pelo programa *STRUCTURE* v.2.3 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003; 2007; Hubisz et al. 2009). O número de clusters foi inferido utilizando 10 corridas independentes com 20.000 burn-ins e 50.000 MCMC (Monte Carlo Markov Chain) iterações após os burn-ins, utilizando o modelo *admixture ancestry*, locos não ligados e frequências alélicas correlacionadas, com  $K$  variando de 2 a 10.

O algoritmo do *STRUCTURE* v.2.3 pode ser efetivo para inferir o número correto de clusters em conjunto de dados que apresentam alguma relação de isolamento por distância. Nos casos em que os padrões de dispersão entre as populações não são homogêneos, a probabilidade log estimada dos dados não fornece uma estimativa correta do número de clusters. Assim, o método  $\Delta K$  de Evanno et al. (2005) foi estimado com intuito de avaliar se o número inferido de clusters apresentaram resultados sensíveis e confiáveis. Estes métodos são uma estatística *ad hoc* que auxilia o pesquisador a encontrar o valor ideal de  $K$ . Por isso, utilizou-se a estatística  $\Delta K$ , com base na taxa de variação entre os valores sucessivos de  $K$ , para inferir o nível de estrutura do conjunto de dados (Evanno et al. 2005). Neste caso, o *STRUCTURE* assume que o genótipo de cada indivíduo em cada locus é totalmente desconhecido.

### **Análise de variância molecular**

A análise de variância molecular (AMOVA) foi efetuada pela decomposição dos componentes principais em diferentes níveis hierárquicos, ou seja: a) tipo de genótipo (variedade local ou variedade melhorada); b) origem dos genótipos [Brasil (BA, MG, PA, CE+RN, AM, PE, PR) e Colômbia], de acordo com a Tabela 1; e c) grupamento teórico obtido pela análise Bayesiana. Estas análises foram realizadas com uso do *software* GenAlEx 6.1 (Peakall e Smouse 2006; 2012).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Seleção das combinações TRAP**

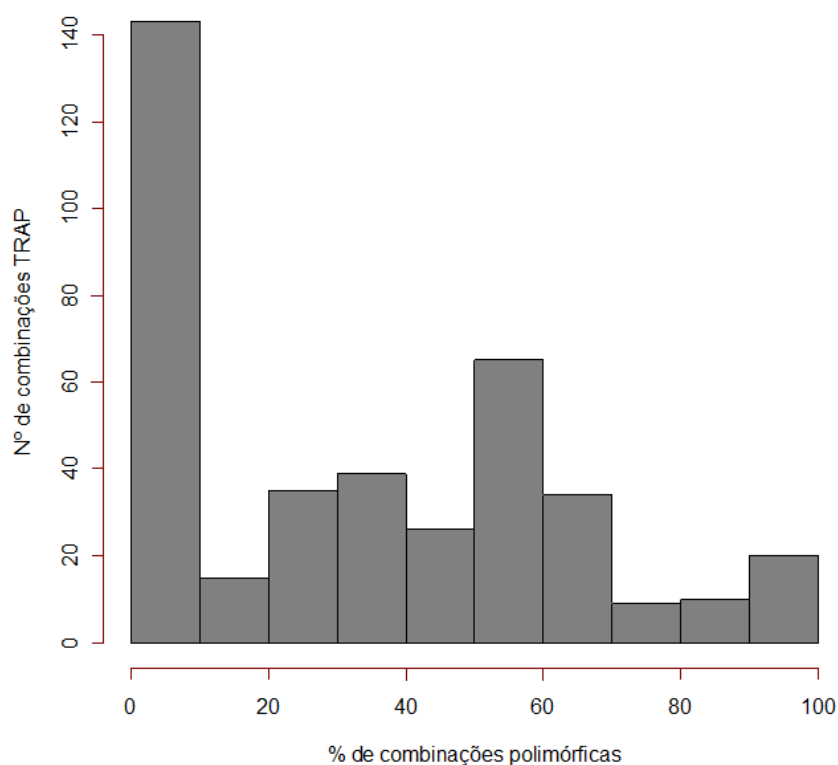
Das 396 combinações de iniciadores TRAP avaliadas, 253 (64%) apresentaram um bom padrão de amplificação e polimorfismo nos quatro genótipos analisados. Para estes iniciadores, o número total de fragmentos variou de 1 a 19, com média de 4,18 fragmentos por combinação de iniciador. O número de fragmentos polimórficos variou de 1 a 9 (variação de 11,11 a 100,00% de bandas polimórficas). O percentual de aproveitamento dos iniciadores TRAP foi muito maior do que os 21% de marcadores RAPD, identificados por Colombo et al. (2000) na análise de 126 acessos de mandioca. Por outro lado, o número médio de fragmentos TRAP amplificados em mandioca (4,18) foi menor que os 37 fragmentos observados em *Caladium*

sp., (Deng et al. 2007) e os aproximadamente 33 em cana-de-açúcar (Alwala et al. 2006a) que também apresenta reprodução assexuada.

Do total, 138 combinações TRAP (35%) apresentaram polimorfismos acima de 50% (Figura 1). Além disso, 45 combinações TRAP apresentaram pelo menos quatro bandas polimórficas, cuja percentagem de polimorfismo variou de 31,5 a 100%. Além do alto polimorfismo, observou-se que os marcadores TRAP podem ser bastante úteis como ferramenta molecular na cultura da mandioca, por não envolverem etapas de restrição de DNA e ligação de adaptadores, como se faz na técnica de AFLP, e ainda produzirem padrões de *fingerprinting* semelhantes a outras metodologias (Deng et al. 2007). Isto faz com que a técnica de TRAP seja de mais fácil implementação e tenha menor custo.

Observou-se que o polimorfismo dos marcadores TRAP variou bastante em função do iniciador arbitrário. De modo geral, os iniciadores Arb2 e Arb3 apresentaram o maior número de fragmentos por marcador, com média de 4,74 e 4,90 respectivamente (Tabela 4). Este mesmo comportamento foi observado para o número médio de bandas polimórficas (1,73 e 2,07 para o Arb2 e Arb3, respectivamente). Por outro lado, o Arb1 apresentou a maior percentagem de polimorfismo (45,1%). Isto se deve ao fato de que, embora este iniciador apresente menor número de fragmentos, a maior parte deles são polimórficos. Comportamento semelhante também foi observado para o Arb3 (Figura 2). Assim, em situações como esta, uma estratégia interessante para maximizar a detecção do polimorfismo em mandioca, seria aumentar o número de iniciadores fixos (análise de outras sequências ESTs) em associação com iniciadores arbitrários mais polimórficos.

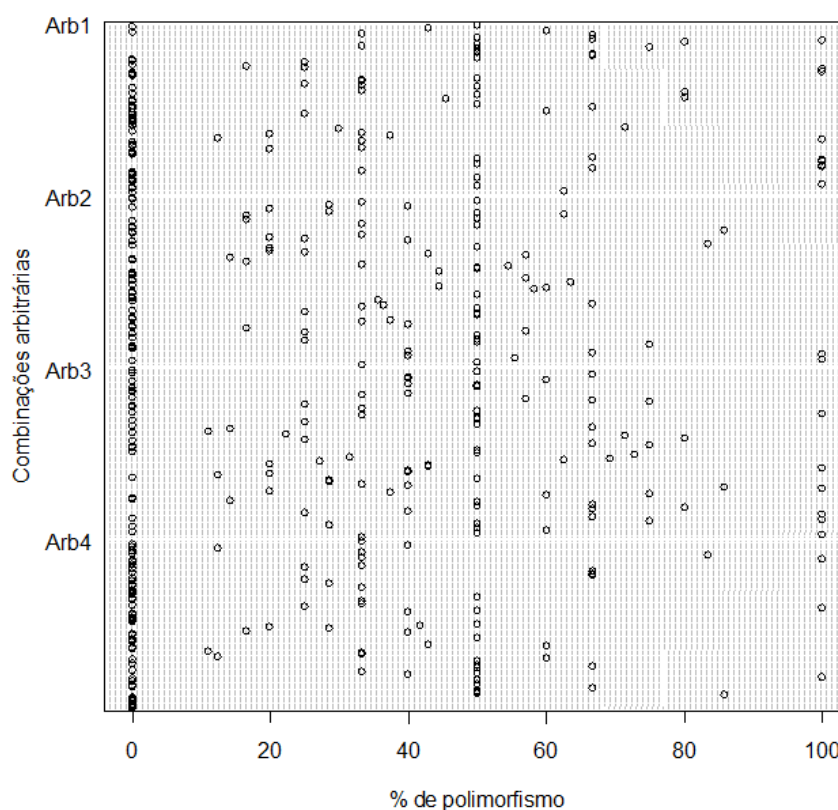
Também foram observadas combinações que não apresentaram polimorfismo (104) e combinações que não apresentaram produtos amplificados (39) (Figura 1). Dentre as combinações que não apresentaram nenhum produto de amplificação, 15, 4, 5 e 15 combinações foram dos iniciadores Arb1, Arb2, Arb3 e Arb4, respectivamente. A ausência de amplificação pode estar relacionada à qualidade da sequência depositada ou pela existência de grandes diferenças genéticas no sítio alvo de amplificação da fonte original utilizada no sequenciamento em relação aos genótipos avaliados.



**Figura 1.** Histograma do número de combinações TRAP - *Target Region Amplification Polymorphism* e percentagem (%) de combinações polimórficas, obtidas nos testes iniciais de amplificação.

**Tabela 4.** Polimorfismo e número total de bandas relacionando os iniciadores arbitrários nos testes iniciais de amplificação com 396 combinações *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP.

| Iniciador arbitrário | Nº de bandas |       | Bandas Polimórficas |       |      |
|----------------------|--------------|-------|---------------------|-------|------|
|                      | Total        | Média | Total               | Média | %    |
| Arb1                 | 333          | 3,36  | 150                 | 1,52  | 45,1 |
| Arb2                 | 469          | 4,74  | 171                 | 1,73  | 36,5 |
| Arb3                 | 485          | 4,90  | 205                 | 2,07  | 42,3 |
| Arb4                 | 370          | 3,74  | 121                 | 1,22  | 32,7 |



**Figura 2.** Gráfico de pontos referente à percentagem de combinações polimórficas para cada iniciador arbitrário da técnica *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP, obtidas nos testes iniciais de amplificação.

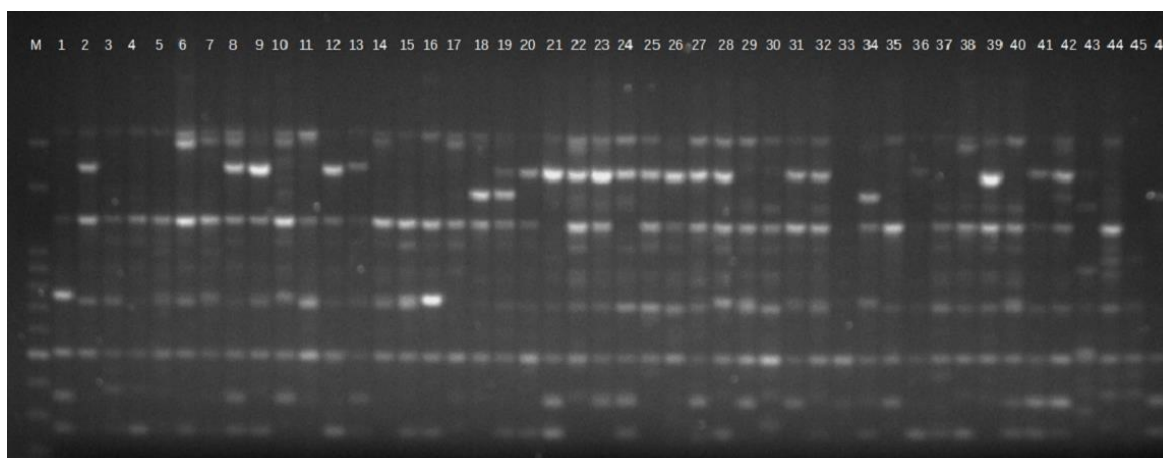
### ***Polimorfismo e poder discriminatório dos marcadores TRAP***

Foram selecionadas 84 combinações (21,21%) de iniciadores TRAP (apenas uma combinação fixo com um dos quatro arbitrários) para a avaliação do potencial polimórfico por meio da caracterização de um conjunto de 46 acessos e variedades de mandioca. Deste total, 15 combinações TRAP apresentaram mais de 10% de dados perdidos, e por isso, foram excluídas das análises (Trap01+Arb2, Trap04+Arb2, Trap14+Arb1, Trap25+Arb3, Trap30+Arb3, Trap37+Arb2, Trap49+Arb3, Trap50+Arb3, Trap63+Arb1, Trap65+Arb1, Trap72+Arb2, Trap74+Arb1, Trap80+Arb2, Trap94+Arb1 e Trap96+Arb3).

Das 69 combinações TRAP analisadas em dezesseis variedades e 30 acessos de mandioca, foram identificados 606 alelos, com média de 8,8 alelos por combinação e variação de três (Trap24+Arb2 e Trap43+Arb4) a 18 alelos

por combinação TRAP (Trap81+Arb3). De modo geral, com a seleção dos melhores iniciadores TRAP observou-se elevado polimorfismo nos acessos de mandioca (Figura 3), cuja percentagem de combinações polimórficas variou de 50 a 100% (Tabela 5). Após a primeira etapa de seleção das combinações mais polimórficas, observou-se que o polimorfismo médio dos iniciadores arbitrários foi bastante próximo, i.e., de 96,43, 93,07, 99,71 e 89,84% para os iniciadores Arb1, Arb2, Arb3 e Arb4, respectivamente. Portanto, o processo de seleção inicial das combinações mais polimórficas é essencial para garantir maiores níveis de polimorfismo ao analisar um conjunto maior de germoplasma.

Comparações com outros tipos de marcadores moleculares dominantes indicam que o polimorfismo dos marcadores TRAP foi elevado, pois o uso de marcadores RAPD (Vieira et al. 2010) e AFLP (Mühlen et al. 2000) na caracterização de germoplasma de mandioca indicou polimorfismos médios de 55,8% e 62,0%, respectivamente, que são menores aos obtidos no presente trabalho com marcadores TRAP (95,53%).



**Figura 3.** Gel de agarose 1000 (2%) ilustrando o padrão de amplificação obtido para a combinação Trap2+Arb3 em 46 acessos de mandioca; M: marcador de peso molecular Ladder 50 pares de base (Ludwig Biotec, Alvorada, Brazil). Números de 1 a 46 representam genótipos analisados (Tabela 1).

Os valores de PIC variaram de 0,03 a 0,38, com média de 0,23 (Tabela 3). Considerando que marcadores TRAP são dominantes, o máximo valor de PIC observável é 0,50. Portanto, quanto mais próximo deste valor, maior o

poder discriminatório do iniciador. Assim, 31 combinações TRAP apresentaram PIC acima de 0,25, tendo assim maior poder de discriminação dentre os genótipos avaliados. Os valores de PIC encontrados em mandioca são comparáveis aos observados pela técnica TRAP em outras culturas, como cana de açúcar (variação de 0,11 a 0,36, e média de 0,24 para 18 combinações TRAP – Alwala et al. 2006b, e variação de 0,20 a 0,35, e média de 0,28 para 16 combinações TRAP – Suman et al. 2012) e *Caladium* Vent. (variação de 0,15 a 0,31, e média de 0,21 para 80 combinações TRAP – Deng et al. 2007). Além disso, os valores de PIC dos marcadores TRAP foram mais informativos que marcadores RAPD em mandioca (variação de 0,00 a 0,27, e média de 0,15 com uso de nove iniciadores – Vieira et al. 2010). Por outro lado, os valores de PIC de marcadores dominantes como os TRAPs são menores do que marcadores codominantes como microssatélites (variação de 0,19 a 0,75 - Fregene et al. 2003; Raji et al. 2009a).

Uma característica importante que define um bom marcador genético é sua capacidade de distinguir os diferentes genótipos. Um critério que vem sendo utilizado para identificar o poder de discriminação de marcadores moleculares é o poder de resolução ( $R_p$ ) (Prevost e Wilkinson 1999). O  $R_p$  indica a informatividade do marcador com base na proporção de bandas presentes em cada combinação. Os valores de  $R_p$  dos iniciadores TRAP variaram de 0,10 a 6,30, com média de 3,21. Entretanto, 37 combinações apresentaram valores de  $R_p$  acima da média, sendo 20 delas comuns às mais polimórficas ( $PIC > 0,25$ ), ou seja, Trap90+Arb4, Trap40+Arb3, Trap88+Arb1, Trap95+Arb3, Trap02+Arb2, Trap93+Arb3, Trap05+Arb3, Trap13+Arb2, Trap59+Arb2, Trap11+Arb3, Trap35+Arb2, Trap99+Arb4, Trap69+Arb2, Trap07+Arb2, Trap18+Arb3, Trap47+Arb3, Trap89+Arb3, Trap20+Arb3, Trap26+Arb3 e Trap81+Arb3. Estes valores de  $R_p$  são comparáveis aos observados por Paliwal et al. (2013), ao analisarem 21 acessos de *Tinospora cordifolia*, com base em 35 marcadores ScoT (*Start Codon Targeted*), cuja variação foi de 0,95 a 5,14, com uma média de 2,6 por iniciador. No entanto, avaliando as relações genéticas em *Diospyros kaki* Thunb. e espécies aliadas os valores de  $R_p$  variaram de 50,67 a 12,95 e portanto maiores daqueles relatados neste trabalho (Lou et al. 2013).



**Tabela 5.** Combinações de iniciadores *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP selecionadas para a análise do polimorfismo em 46 genótipos de mandioca.

| Combinação  | Nº de bandas |                   | %Poli  | PIC <sup>2</sup> | Rp <sup>3</sup> | Combinação  | Nº de bandas |      | %Poli  | PIC  | Rp   |
|-------------|--------------|-------------------|--------|------------------|-----------------|-------------|--------------|------|--------|------|------|
|             | Total        | Poli <sup>1</sup> |        |                  |                 |             | Total        | Poli |        |      |      |
| Trap02+Arb2 | 8            | 8                 | 100,00 | 0,26             | 3,80            | Trap45+Arb3 | 14           | 13   | 92,86  | 0,23 | 4,70 |
| Trap03+Arb3 | 10           | 10                | 100,00 | 0,03             | 0,10            | Trap46+Arb2 | 8            | 8    | 100,00 | 0,21 | 2,20 |
| Trap05+Arb3 | 7            | 7                 | 100,00 | 0,30             | 3,90            | Trap47+Arb3 | 8            | 8    | 100,00 | 0,25 | 5,10 |
| Trap06+Arb1 | 10           | 10                | 100,00 | 0,21             | 4,00            | Trap48+Arb3 | 13           | 13   | 100,00 | 0,24 | 4,90 |
| Trap07+Arb2 | 11           | 11                | 100,00 | 0,26             | 4,30            | Trap52+Arb3 | 10           | 10   | 100,00 | 0,19 | 2,70 |
| Trap08+Arb2 | 8            | 8                 | 100,00 | 0,20             | 3,10            | Trap57+Arb2 | 6            | 6    | 100,00 | 0,21 | 1,70 |
| Trap09+Arb2 | 7            | 6                 | 85,71  | 0,18             | 2,60            | Trap58+Arb2 | 4            | 2    | 50,00  | 0,10 | 0,40 |
| Trap10+Arb1 | 5            | 5                 | 100,00 | 0,20             | 2,00            | Trap59+Arb2 | 7            | 7    | 100,00 | 0,28 | 4,00 |
| Trap11+Arb3 | 11           | 9                 | 81,82  | 0,25             | 4,10            | Trap60+Arb1 | 12           | 12   | 100,00 | 0,18 | 4,90 |
| Trap13+Arb2 | 9            | 9                 | 100,00 | 0,27             | 4,00            | Trap61+Arb3 | 10           | 10   | 100,00 | 0,20 | 4,30 |
| Trap16+Arb2 | 6            | 4                 | 66,67  | 0,09             | 0,90            | Trap66+Arb1 | 11           | 11   | 100,00 | 0,21 | 4,30 |
| Trap17+Arb3 | 12           | 12                | 100,00 | 0,22             | 3,50            | Trap68+Arb1 | 14           | 12   | 85,71  | 0,22 | 4,50 |
| Trap18+Arb3 | 11           | 11                | 100,00 | 0,26             | 4,80            | Trap69+Arb2 | 13           | 12   | 92,31  | 0,28 | 4,20 |
| Trap19+Arb3 | 9            | 9                 | 100,00 | 0,22             | 2,60            | Trap70+Arb2 | 8            | 8    | 100,00 | 0,27 | 1,80 |
| Trap20+Arb1 | 12           | 12                | 100,00 | 0,22             | 5,50            | Trap71+Arb3 | 6            | 6    | 100,00 | 0,21 | 0,80 |
| Trap20+Arb3 | 15           | 15                | 100,00 | 0,25             | 5,30            | Trap75+Arb3 | 6            | 6    | 100,00 | 0,30 | 1,20 |
| Trap21+Arb3 | 11           | 11                | 100,00 | 0,17             | 1,60            | Trap76+Arb3 | 4            | 4    | 100,00 | 0,26 | 1,50 |
| Trap22+Arb4 | 5            | 5                 | 100,00 | 0,20             | 2,00            | Trap77+Arb2 | 7            | 7    | 100,00 | 0,13 | 1,20 |
| Trap24+Arb2 | 3            | 3                 | 100,00 | 0,38             | 0,50            | Trap79+Arb4 | 7            | 5    | 71,43  | 0,31 | 2,30 |
| Trap26+Arb3 | 10           | 10                | 100,00 | 0,27             | 5,40            | Trap81+Arb3 | 18           | 18   | 100,00 | 0,25 | 6,30 |
| Trap27+Arb3 | 7            | 7                 | 100,00 | 0,29             | 3,20            | Trap82+Arb4 | 6            | 6    | 100,00 | 0,27 | 1,40 |
| Trap28+Arb3 | 13           | 13                | 100,00 | 0,24             | 6,30            | Trap84+Arb1 | 7            | 6    | 85,71  | 0,20 | 1,50 |
| Trap29+Arb4 | 10           | 9                 | 90,00  | 0,24             | 4,90            | Trap85+Arb1 | 6            | 6    | 100,00 | 0,31 | 3,00 |
| Trap31+Arb4 | 10           | 10                | 100,00 | 0,23             | 3,50            | Trap86+Arb1 | 6            | 6    | 100,00 | 0,24 | 1,40 |
| Trap32+Arb1 | 10           | 10                | 100,00 | 0,23             | 5,30            | Trap88+Arb1 | 6            | 6    | 100,00 | 0,32 | 3,50 |
| Trap33+Arb4 | 11           | 10                | 90,91  | 0,23             | 4,20            | Trap89+Arb3 | 13           | 13   | 100,00 | 0,26 | 5,10 |
| Trap34+Arb1 | 11           | 11                | 100,00 | 0,20             | 3,50            | Trap90+Arb4 | 13           | 9    | 69,23  | 0,25 | 3,30 |
| Trap35+Arb2 | 8            | 7                 | 87,50  | 0,25             | 4,20            | Trap91+Arb1 | 4            | 3    | 75,00  | 0,06 | 0,30 |
| Trap36+Arb2 | 7            | 7                 | 100,00 | 0,26             | 2,50            | Trap92+Arb1 | 6            | 6    | 100,00 | 0,25 | 1,80 |
| Trap38+Arb4 | 14           | 14                | 100,00 | 0,18             | 5,80            | Trap93+Arb3 | 9            | 9    | 100,00 | 0,29 | 3,80 |
| Trap39+Arb2 | 9            | 9                 | 100,00 | 0,24             | 3,70            | Trap95+Arb3 | 7            | 7    | 100,00 | 0,32 | 3,70 |
| Trap40+Arb3 | 11           | 11                | 100,00 | 0,25             | 3,30            | Trap97+Arb1 | 7            | 7    | 100,00 | 0,26 | 2,20 |
| Trap41+Arb4 | 7            | 7                 | 100,00 | 0,22             | 2,50            | Trap98+Arb3 | 6            | 6    | 100,00 | 0,22 | 3,00 |
| Trap42+Arb3 | 7            | 7                 | 100,00 | 0,23             | 2,60            | Trap99+Arb4 | 6            | 6    | 100,00 | 0,28 | 4,20 |
| Trap43+Arb4 | 3            | 2                 | 66,67  | 0,22             | 1,00            |             |              |      |        |      |      |

<sup>1</sup>Poli: Polimorfismo; <sup>2</sup>PIC: *Polymorphism Information Content*; <sup>3</sup>Rp: Poder de resolução do marcador.

As variações genéticas que resultam em polimorfismos na sequência de DNA podem ser funcionais, por causar mudanças no metabolismo celular ou em características fenotípicas ou neutras quando não estão sujeitos à seleção positiva ou negativa (Marsjan e Oldenbroek 2007). Os polimorfismos moleculares que surgem devido a mutações podem resultar em um aumento ou diminuição da eficiência metabólica, bem como em alterações nos padrões de expressão gênica em diversos níveis. Atualmente, existe uma necessidade de ganhar eficiência nos programas de melhoramento genético por meio da integração da informação genômica funcional com a genética de forma a elucidar a relação funcional entre genótipo e fenótipo. Assim, um dos grandes desafios dos programas de melhoramento é fazer a escolha correta de marcadores genéticos moleculares para a identificação das variações funcionais em rotas metabólicas específicas e de maior interesse nas culturas alvo.

Especificamente no caso da mandioca, as 99 sequências ESTs relacionadas aos iniciadores deste trabalho estão associadas a distintas rotas metabólicas relacionadas (Tabela 2). Contudo, a análise genética de alguns genes associados a estas rotas metabólicas, com base em marcadores TRAP indicaram maior polimorfismo (considerando um mínimo de 70% de fragmentos polimórficos, PIC >0,25 e Rp >3,21) nos genes associados à biossíntese de amido (Trap13+Arb2), carotenoides (Trap05+Arb3, Trap07+Arb2 e Trap40+Arb3), compostos cianogênicos (Trap18+Arb3), deterioração fisiológica pós-colheita (Trap59+Arb2, Trap81+Arb3, Trap89+Arb3, Trap93+Arb3 e Trap95+Arb3), formação de raízes tuberosas (Trap20+Arb3), proteção contra estresse oxidativo (Trap11+Arb3) e resposta de defesa contra patógenos (Trap35+Arb2, Trap02+Arb2 e Trap47+Arb3) (Tabela 5).

Suman et al. (2012) relataram um alto nível de polimorfismo em 64 genótipos pertencentes a oito espécies de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), ao analisarem quatro genes associados à rota metabólica de lignina em cana-de-açúcar, com uso da técnica TRAP. Por outro lado, este polimorfismo foi menor em genes associados à rota metabólica de sacarose, bem como de tolerância ao frio e seca (Alwala et al. 2006b). Isto indica, que mesmo se tratando de regiões genômicas associadas a fenótipos específicos, a garantia de uma

maior cobertura genômica pela técnica de TRAP, precisa ser precedida por etapas de otimização do polimorfismo em genes alvo.

### ***Alelos privados de marcadores TRAP***

Alguns iniciadores TRAP foram capazes de identificar alelos privados, ou seja, presentes em um único indivíduo em determinados genótipos (Tabela 6). Observou-se 37 fragmentos privados em 20 dos 46 genótipos de mandioca avaliados. Em relação aos genótipos, foram observados de um (98150-06, BGM0048, BGM0050, BGM0066, BGM0289, BGM1116, BGM1291, BGM1632, BGM1728, BGM2038, BRS Caipira e BRS Verdinha) a nove alelos privados (BGM1341) (Tabela 6).

A presença de alelos privados pode estar relacionada com algum grau de evolução ou adaptação a ambientes específicos que podem gerar estruturas populacionais diferenciadas, ou mesmo alguma característica específica do marcador utilizado. Assim, a presença de alelos privados é um componente importante para diferenciação de espécies e até mesmo indivíduos dentro das espécies com características específicas. Portanto, a identificação de diversos alelos privados em mandioca com a técnica de TRAP, indica o seu grande potencial de uso como marcador genético, para nortear estratégias de conservação da variabilidade e mesmo ações relacionadas ao melhoramento da cultura.

**Tabela 6.** Relação de alelos privados detectados em 27 combinações de iniciadores *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP.

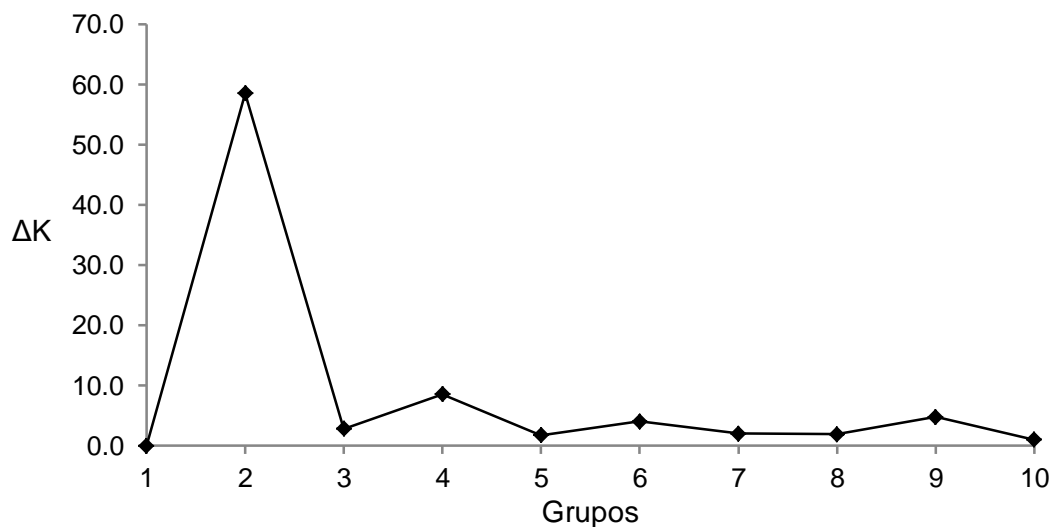
| <b>Acessos</b>      | <b>Combinação/alelo</b> | <b>Processo biológico</b>                  |
|---------------------|-------------------------|--|
| 96207-05            | Trap38+Arb4 (180pb)     | Sinal de transdução                        |
|                     | Trap61+Arb3 (600pb)     | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| 98150-06            | Trap39+Arb2 (NE*pb)     | Biossíntese de carotenoides                |
| BGM0004             | Trap20+Arb1 (650pb)     | Formação de raízes tuberosas               |
|                     | Trap31+Arb4 (1000pb)    | Metabolismo de ATP                         |
| BGM0006             | Trap32+Arb1 (800pb)     | Biossíntese de amido                       |
|                     | Trap68+Arb1 (510pb)     | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| BGM0019             | Trap32+Arb1 (850pb)     | Biossíntese de amido                       |
|                     | Trap46+Arb2 (240pb)     | Resposta de defesa XAM                     |
|                     | Trap66+Arb1 (300pb)     | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| BGM0048             | Trap17+Arb3 (400pb)     | Formação de raízes tuberosas               |
| BGM0050             | Trap90+Arb4 (900pb)     | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| BGM0066             | Trap22+Arb4 (1050pb)    | Metabolismo de glicose                     |
| BGM0289             | Trap34+Arb1 (1500pb)    | Resposta de defesa                         |
| BGM1116             | Trap38+Arb4 (230pb)     | Sinal de transdução                        |
| BGM1179             | Trap06+Arb1 (1050pb)    | Biossíntese de carotenoides                |
|                     | Trap34+Arb1 (1100pb)    | Resposta de defesa                         |
|                     | Trap98+Arb3 (650pb)     | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| BGM1291             | Trap81+Arb3 (1300pb)    | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| BGM1341             | Trap02+Arb2 (650pb)     | Resposta de defesa XAM                     |
|                     | Trap08+Arb2 (300pb)     | Biossíntese de carotenoides                |
|                     | Trap20+Arb3 (500pb)     | Formação de raízes tuberosas               |
|                     | Trap21+Arb3 (1000pb)    | Biossíntese de carotenoides                |
|                     | Trap33+Arb4 (140pb)     | Biossíntese de amido                       |
|                     | Trap33+Arb4 (160pb)     | Biossíntese de amido                       |
|                     | Trap38+Arb4 (390pb)     | Sinal de transdução                        |
|                     | Trap52+Arb3 (400pb)     | Compostos cianogênicos                     |
| Trap52+Arb3 (450pb) | Compostos cianogênicos  |  |
| BGM1632             | Trap71+Arb3 (1500pb)    | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| BGM1660             | Trap03+Arb3 (1300pb)    | Estresse oxidativo e balanço de nutrientes |
|                     | Trap41+Arb4 (1000pb)    | Biossíntese de carotenoides                |
| BGM1728             | Trap16+Arb2 (300pb)     | Biossíntese de carotenoides                |
| BGM2038             | Trap45+Arb3 (475pb)     | Biossíntese de carotenoides                |
| BGM2050             | Trap06+Arb1 (340pb)     | Biossíntese de carotenoides                |
|                     | Trap98+Arb3 (600pb)     | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| BRS Caipira         | Trap81+Arb3 (220pb)     | Deterioração fisiológica pós-colheita      |
| BRS Verdinha        | Trap13+Arb2 (1500pb)    | Biossíntese de amido                       |

\*NE = não estimado.

Moyib et al. (2012) utilizaram 18 marcadores microssatélites para caracterização de 43 variedades melhoradas de mandioca, previamente avaliadas quanto à resistência à podridão radicular. Como resultado deste trabalho foi identificado três alelos privados presentes nas classes de variedades altamente suscetíveis (SSRY12), suscetíveis (SSRY101) e resistentes à podridão radicular (SSRY177). Em outro estudo, Alves-Pereira et al. (2011) analisaram 10 locos de microssatélites para estudar a diversidade genética e estruturação de variedades de mandioca cultivadas em diferentes tipos de solo ao longo do Rio Madeira (Amazônia Central, Brasil). Neste estudo, foram encontrados 21 alelos privados presentes em variedades com alto teor de compostos cianogênicos (“amargas”), enquanto que nas variedades com baixo teor de compostos cianogênicos (“doce”) não foram observados. A maioria dos alelos privados estava em baixas frequências, mas, curiosamente, variedades coletadas em áreas sujeitas à inundação apresentaram alelos privados em maior frequência ( $>0,05$ ). Por outro lado, em espécies domesticadas com baixa variação genética, como é o caso da mamona, a existência de alelos privados, mesmo com marcadores de alta densidade como SNPs não tem sido relatada (Foster et al. 2010).

### ***Análise de agrupamento***

O agrupamento com base na análise Bayesiana, que considera todos os genótipos sem informação de origem (Pritchard et al. 2000), associado ao método de Evanno et al. (2005), revelou a presença de dois grupos principais ( $k = 2$ ) e quatro subgrupos ( $k = 4$ ) (Figura 3). Segundo Evanno et al. (2005), em modelos mais complexos, o *STRUCTURE* detecta o maior nível hierárquico. Isto poderia explicar o primeiro nível hierárquico com  $K = 2$  e um segundo nível com  $K = 4$ .



**Figura 3:** Estimativa de  $\Delta K$  em função do número de grupos ( $k$ ) de acordo com a metodologia desenvolvida por Evanno et al. (2005).

Hierarquias semelhantes foram observadas em outras espécies de propagação vegetativa. Emanuelli et al. (2013) investigaram os padrões de diversidade molecular utilizando 22 microssatélites e 384 SNPs em 2273 acessos de videira domesticadas (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*), espécies silvestres (*V. vinifera* spp *sylvestris*), híbridos interespecíficos e porta-enxertos. Os resultados destes autores demonstraram a presença de um primeiro nível hierárquico com  $K = 2$ , tanto para marcadores microssatélites quanto SNPs, e picos de  $\Delta K$  para  $K = 3$  (microssatélites e SNPs) e  $K = 6$  (microssatélites). A estrutura com  $K = 2$  possibilitou a discriminação dos acessos de *Vitis* não-*vinifera* (porta-enxertos) dos acessos *V. vinifera* (*sativa* e *sylvestris*).

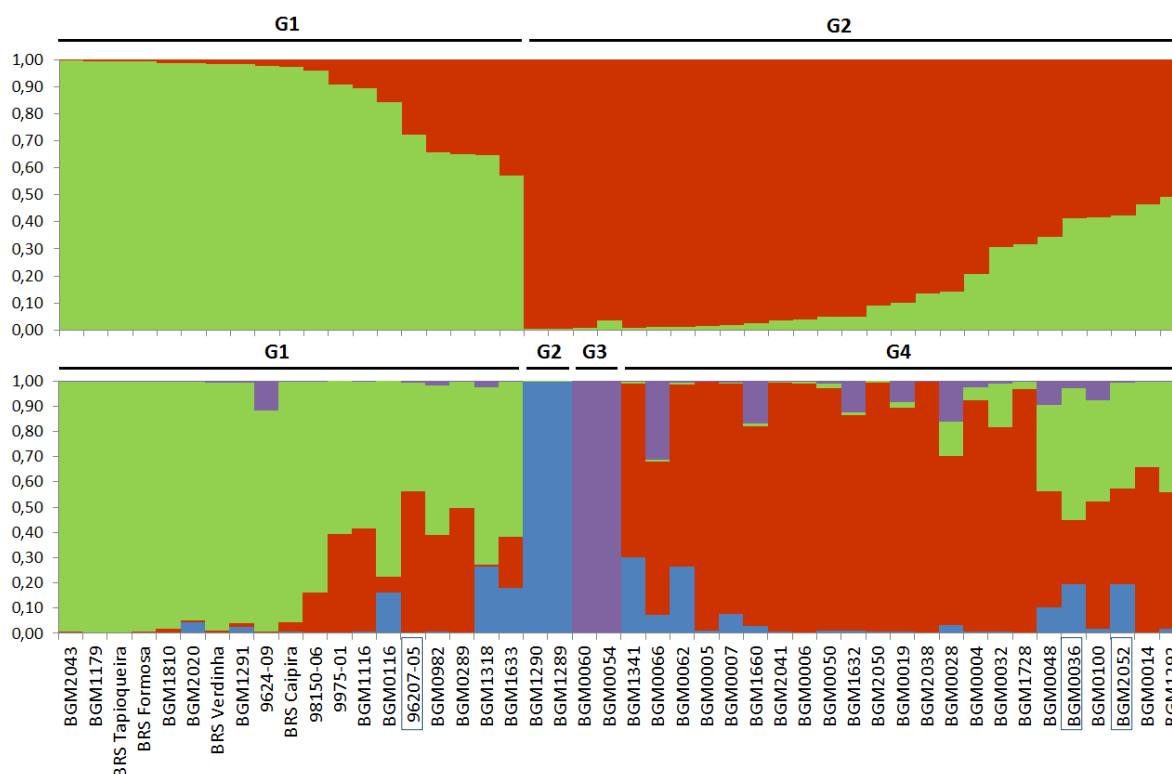
A análise Bayesiana com  $K = 2$  indicou que a maioria dos indivíduos no Grupo 1 (63%) e Grupo 2 (59%) possui uma alta ancestralidade em cada grupo ( $Q > 0,90$ ), muito embora esta probabilidade seja bastante variável dentro dos grupos (0,57 a 0,99 no Grupo 1 e 0,51 a 0,99 no Grupo 2) (Figura 4). A participação dos indivíduos em populações distintas indica que compartilham algumas regiões genômicas. Ao considerarmos a ancestralidade, observa-se que os genótipos BGM1633, BGM0036, BGM0100, BGM2052, BGM0014 e BGM1292 compartilham diversos alelos em ambos os grupos ( $0,51 < Q < 0,59$ ). Por outro lado, com  $K = 4$  os indivíduos dos Grupos 2 e 3 apresentaram uma alta probabilidade de alocação dentro destes grupos (0,99), enquanto que no Grupo 1 esta probabilidade variou de 0,42 (BGM2052) a 0,99 (BGM1179). No Grupo 4

esta variação foi de 0,46 (BGM0048) a 0,99 (BGM2038) (Figura 4). Utilizando esta subestrutura, observou-se que de modo geral, houve uma alta porcentagem de mistura em muitos acessos dos Grupos 1 e 4, com possibilidade de alocação em mais de um grupo (Figura 4). Caso fosse adotado um critério mínimo de atribuição de 0,60, cerca de 20% dos acessos não seriam alocados em nenhum grupo. Quinze dos 46 acessos analisados foram identificados como provenientes de uma única fonte ( $Q > 0,97$ ).

A presença de misturas nos genótipos dificulta a sua alocação em grupos de diversidade bem definidos, mesmo com modelos de estrutura populacional bastante rigorosos como os implementados pelo *STRUCTURE*. Em um estudo desta natureza, Twito et al. (2007), verificaram que 25 SNPs oriundos de regiões gênicas foram capazes de atribuir corretamente apenas 12 raças de galinha, enquanto outras oito raças diversas foram excluídas da análise por apresentarem sérios problemas com a atribuição a populações específicas.

Ao estruturar os genótipos de mandioca com  $K = 2$  e 4, observou-se que o clone melhorado 96207-05 presente no Grupo 1, com  $K = 2$  foi alocado no Grupo 4, quando se considerou a estrutura do subgrupo ( $K = 4$ ), enquanto que os acessos BGM0036 e BGM2052, previamente alocados no Grupo 2 com  $K = 2$ , foram realocados no Grupo 1 quando se utilizou  $K = 4$  (Figura 4). Em todas estas situações, quando se analisou a estruturação do subgrupo ( $K = 4$ ), a ancestralidade destes genótipos foi bastante baixa, sendo 0,56, 0,52 e 0,42 para 96207-05, BGM0036 e BGM2052, respectivamente. Uma possível explicação para isso pode ser a presença de cruzamentos múltiplos entre diferentes indivíduos ao longo do processo de domesticação da espécie.

Observações de ancestralidade múltipla à medida que se aumenta a subdivisão das populações foram observadas em espécies como o esturjão branco (*Acipenser transmontanus* R.), na qual alguns indivíduos apresentaram uma alta ancestralidade em um determinado grupo com  $K = 2$  ( $Q > 0,95$ ), porém quando se assumiu  $K = 3$ , a ancestralidade destes indivíduos foi dividida em dois grupos, cada uma com um coeficiente de adesão de 0,50 (Schreier et al. 2012).



**Figura 4.** Agrupamento inferido pela análise Bayesiana implementada pelo software *STRUCTURE* v.2.3 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003; 2007; Hubisz et al. 2009) para K = 2 e 4. Os genótipos estão representados na linha vertical, e cada agrupamento genético por uma cor distinta. Cada linha vertical representa um indivíduo fracionado em segmentos cuja coloração e tamanho são proporcionais à porcentagem de alelos compartilhados em cada grupo. Em detalhe acessos classificados em diferentes grupos para K = 2 e K = 4.

### **Análise de Variância Molecular (AMOVA)**

Considerando as informações de passaporte sobre a origem dos acessos realizou-se a AMOVA (Tabela 7) para determinar o grau de diferenciação genética entre os acessos. Utilizando esta hierarquia, observou-se que a maior parte da variação está presente dentro dos grupos (99,37%). Em gergelim, a análise de 32 marcadores AFLP indicou que mesmo com apenas 5% da variância entre grupos, houve diferença significativa entre grupos ( $P < 0,05$ ), com base no teste de permutações. Esta diferenciação ocorreu basicamente em função da grande diferença existente entre acessos da Ásia Central em relação aos outros centros de diversidade (Laurentin e Karlovsky 2006). No caso específico da mandioca, observou-se a inexistência



de diferenciação dos acessos com base na sua organização em função da origem geográfica ( $\text{PhiPT} = 0,006^{\text{ns}}$ ).

**Tabela 7.** Análise da variância molecular (AMOVA), considerando as informações de origem dos acessos, conforme apresentado na Tabela 1, utilizando 553 marcas *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP em 46 genótipos de mandioca.

| FV                | GL | SQ      | QM    | E(QM) | % de<br>variação | PhiPT               |
|-------------------|----|---------|-------|-------|------------------|---------------------|
| Entre grupos      | 7  | 634,43  | 90,63 | 0,55  | 0,63             | $0,006^{\text{ns}}$ |
| Dentro dos grupos | 38 | 3298,07 | 86,79 | 86,77 | 99,37            |                     |
| Total             | 45 | 3932,50 |       |       |                  |                     |

GL = Grau de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, E(QM) = estimativa da variância. PhiPT = índice de fixação de alelos, ns = não significativo.

A distribuição da diversidade genética em plantas depende da sua evolução, sistema de reprodução, fatores ecológicos e geográficos e muitas vezes das atividades humanas (Ramanatha e Hodgkin 2002). No caso específico da mandioca, a polinização cruzada desempenha um papel importante neste mecanismo evolutivo, uma vez que a taxa de cruzamento pode variar de 69 a 100% dependendo do acesso (Silva et al. 2003). Fatores ecológicos e geográficos também têm apresentado um papel importante na evolução de mandioca (Chavarriaga-Aguirre e Halsey 2005). Do ponto de vista da domesticação, estima-se que o homem tenha iniciado sua relação com a mandioca cerca de 5000 a 7000 AC, de acordo com achados arqueológicos (Gibbons 1990). Entretanto, o fluxo de materiais dentro do Brasil e até mesmo em diferentes países tenha se acentuado nos últimos 30 anos. Geralmente esta troca/migração é acompanhada pela troca de nomes dos genótipos o que induz a erros na atribuição correta da origem do acesso. Isto certamente tem contribuído para a baixa associação entre diversidade molecular e origem geográfica. Observação desta natureza foi realizada por Mezette et al. (2013) ao analisarem 419 acessos de mandioca com base em características morfológicas, na qual a maior parte da variação genética foi encontrada para dentro das regiões de obtenção do germoplasma (95,6%). Isto implica em

baixa diferenciação dos genótipos entre as regiões, provavelmente como resultado do fluxo de genes e troca de genótipos entre as regiões.

Considerando a divisão dos acessos com base na sua forma de obtenção, seja na forma de coleta, na natureza ou oriundos de programas de melhoramento genético, também se observou maior parte da variação genética presente dentro destes dois grupos (Tabela 8), porém, observou-se uma diferença significativa entre grupos ( $\Phi_{PT} = 0,125$ ,  $p < 0,01$ ). Estes resultados são comparáveis aos observados por Raji et al. (2009b) ao avaliarem um conjunto de variedades locais africanas e cultivares elite com base em 20 marcadores AFLP e 50 microssatélites, na qual se observou 83% da variação dentro das populações e 17% entre as variedades locais e variedades elite. Estes autores ainda observaram que as cultivares de elite foram agrupados na maioria dos casos de acordo com seu pedigree, porém com baixa variação genética em comparação com as variedades locais.

No presente trabalho, a maioria das variedades melhoradas de mandioca (69%) foi alocada no Grupo (K = 2), enquanto as demais (BGM2041, BGM2050, BGM1728, BGM0100 e BGM0014) foram alocadas no Grupo 4 (Figura 4). Em mandioca, é comum a coleta de variedades locais que após um intenso processo de adaptação e validação agrônômica em diferentes regiões produtoras sejam recomendadas como variedades melhoradas, sem serem clones originados de hibridação. Assim, é possível que um acesso seja classificado como melhorado por ser uma variedade recomendada, quando de fato foi obtido por introdução de germoplasma. Este pode ser o caso específico dos acessos BGM2041, BGM0100 e BGM0014, que são oriundos de doações de antigos programas de melhoramento do Centro de Pesquisa do Cacau - CEPEC e Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Leste - IPEAL, e que por isso não se sabe corretamente a forma de obtenção, se por coleta ou hibridação. Estas incoerências fazem com que os dados de passaporte devam ser observados com cautela nos estudos de diversidade e agrupamento genético. Apesar disso, observou-se uma boa formação de grupos de diversidade de mandioca, levando em consideração o padrão de melhoramento.

**Tabela 8.** Análise da variância molecular (AMOVA), considerando a forma de obtenção dos acessos, em coleta e melhoramento, utilizando 553 marcas *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP em 46 genótipos de mandioca.

| FV                | GL | SQ      | QM     | E(QM) | % de variação | PhiPT   |
|-------------------|----|---------|--------|-------|---------------|---------|
| Entre grupos      | 1  | 111,74  | 111,74 | 12,45 | 12,55         | 0,125** |
| Dentro dos grupos | 44 | 3820,76 | 86,84  | 86,78 | 87,45         |         |
| Total             | 45 | 3932,50 |        |       |               |         |

GL = Grau de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, E(QM) = estimativa da variância. PhiPT = índice de fixação de alelos, \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo método de randomização, utilizando 999 permutações.

Ao considerar os agrupamentos com dois ( $K = 2$ ) ou quatro grupos ( $K = 4$ ), de acordo com a análise Bayesiana sem considerar indivíduos com ancestralidade misturada, observou-se que a maior parte da variação genética está presente dentro dos grupos, porém com uma importante diferença existente entre os grupos formados com ambos os tipos de estruturação (PhiPT = 0,139 e 0,138,  $p < 0,01$ , respectivamente) (Tabelas 9 e 10).

**Tabela 9.** Análise da variância molecular (AMOVA), considerando os dois grupos formados pelo *STRUCTURE*, com base na análise de 553 marcas *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP em 46 genótipos de mandioca.

| FV                | GL | SQ      | QM     | E(QM) | % de variação | PhiPT   |
|-------------------|----|---------|--------|-------|---------------|---------|
| Entre grupos      | 1  | 114,83  | 114,83 | 14,03 | 13,92         | 0,139** |
| Dentro dos grupos | 44 | 3817,67 | 86,77  | 86,78 | 86,08         |         |
| Total             | 45 | 3932,50 |        |       |               |         |

GL = Grau de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, E(QM) = estimativa da variância. PhiPT = índice de fixação de alelos, ns = não significativo. \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo método de randomização, utilizando 999 permutações.

Ao utilizarem informações de agrupamento da análise Bayesiana para a partição da variabilidade genética pela AMOVA, Wang et al. (2014), também observaram que a maior parte da diversidade genética estava dentro dos grupos (1,87% para  $K = 4$  e 3,48% para  $K = 7$ ), ao analisarem acessos de damasco siberiano oriundos de 22 populações da China, com base em marcadores microssatélites. Além disso, com as populações agrupadas de acordo com a origem geográfica, uma menor percentagem de variação (1,98%) foi explicada pelos fatores geográficos.

Geralmente informações taxonômicas, origem geográfica dos acessos, condições edafoclimáticas, formas de coleta e obtenção, data de coleta, dentre outras, constam nos dados de passaporte do acesso. Portanto, os dados de passaporte são de fundamental importância para o uso e gestão eficaz de coleções de germoplasma, sendo inclusive utilizados pelos curadores de germoplasma e melhoristas para agrupamento de acessos, elaborar coleções nucleares ou identificar redundâncias e lacunas nas coleções de germoplasma (Hazekamp 2002). Entretanto, mesmo com toda esta importância, os dados de passaporte do BAG-Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura são antigos e muitas informações estão incompletas e em alguns casos observam-se algumas incoerências. Por exemplo, muitos acessos não foram coletados *in situ*, mas sim intercambiados com outras coleções nacionais, porém nos dados de origem constam a localização da instituição doadora e não a origem de coleta. Além disso, muitos acessos foram doados por agricultores que simplesmente enviavam os acessos com um mínimo de descrição do material. Adicionalmente, muitos acessos também foram acrescentados ao banco a partir de coletas em locais isolados com um mínimo de informação sobre a origem do material.

Tudo isso faz com que as informações geradas pelos marcadores moleculares sejam mais interessantes para a caracterização do material genético, por fornecer informações mais precisas e detalhadas em comparação com as informações de passaporte, a exemplo das inconsistências observadas em relação à origem geográfica dos acessos (Colombo et al. 2000; Kawuki et al. 2009; Asare et al. 2011; Mezette et al. 2013). Além disso, com o avanço das técnicas moleculares e formas de genotipagem as informações moleculares, a exemplo dos iniciadores TRAP desenvolvidos no presente trabalho, tendem a

ser a forma mais rápida e prática para conduzir estudos sobre os recursos genéticos de mandioca em grande escala para um grande número de acessos.

**Tabela 10.** Análise da variância molecular (AMOVA), considerando os quatro grupos formados pelo *STRUCTURE*, com base na análise de 553 marcas *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP em 46 genótipos de mandioca.

| FV                | GL | SQ      | QM     | E(QM) | % de variação | PhiPT   |
|-------------------|----|---------|--------|-------|---------------|---------|
| Entre grupos      | 3  | 412,85  | 137,62 | 13,45 | 13,83         | 0,138** |
| Dentro dos grupos | 42 | 3519,65 | 83,80  | 83,80 | 86,17         |         |
| Total             | 45 | 3932,50 |        |       |               |         |

GL = Grau de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, E(QM) = estimativa da variância. PhiPT = índice de fixação de alelos.\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo método de randomização, utilizando 999 permutações.

### ***Implicações para a pesquisa com germoplasma e melhoramento***

Considerando que a identificação e o uso apropriado da variação genética constituem-se numa das principais etapas do melhoramento de plantas, é preciso investir em técnicas e procedimentos que permitam a obtenção de respostas rápidas e precisas para a análise de germoplasma ou populações segregantes. Em relação à detecção da variação genética, observa-se que de modo geral, a caracterização molecular possui algumas vantagens importantes em relação aos marcadores morfo-agronômicos como a possibilidade de análise em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e a partir de qualquer tecido sem influência ambiental. Particularmente os marcadores TRAP possuem a vantagem de não apresentarem custo para sua descoberta, após a obtenção das sequências expressas (Kwon et al. 2010), além de terem suas supostas funções por análises de homologia (Zhang et al. 2010).

Em relação à identificação de variações genéticas no germoplasma de mandioca, os marcadores TRAP poderão contribuir para aumentar o uso de recursos genéticos, pois as informações genotípicas permitem estabelecer o

grau de parentesco e relacionamento dos acessos, possibilitando a identificação de duplicatas e otimização da conservação. Além disso, os marcadores TRAP poderão contribuir para o estabelecimento de coleções nucleares representativas da riqueza alélica do germoplasma, que poderão ser alvo de intensas avaliações fenotípicas para características de importância agrônômica visando até mesmo à associação alélica dos marcadores TRAP a variantes fenotípicas passíveis de seleção indireta.

Do ponto de vista do melhoramento genético, os marcadores TRAP desenvolvidos no presente trabalho poderão contribuir para o desenvolvimento de mapas genéticos saturados visando à identificação de genes ou locos controladores de características quantitativas (QTLs) de grande importância econômica, a exemplo de deterioração fisiológica pós-colheita, resistência a doenças como couro de sapo, bacteriose e podridão radicular, além de características produtivas como produtividade de raiz e amido. Além do mapeamento em cruzamentos biparentais, os marcadores TRAP poderão contribuir para o mapeamento associativo, seleção genômica e até mesmo na mineração de alelos úteis a determinados processos biológicos.

Estas aplicações feitas até então em culturas de grande expressão comercial, como milho, soja, tomate e trigo, poderão se tornar uma realidade para culturas órfãs como é o caso da mandioca. Nas grandes culturas, o melhoramento assistido por marcadores moleculares tem contribuído sobremaneira para melhorar a predição do fenótipo através do genótipo utilizando diferentes ferramentas e estratégias genômicas (Pérez-de-Castro et al. 2012; Lado et al. 2013). Este processo pode acelerar o desenvolvimento de novas cultivares de mandioca com alto potencial produtivo e resistência ou tolerância a estresses bióticos ou abióticos, considerando a facilidade e praticidade de se trabalhar com amostras de DNA ao invés dos altos custos e baixa acurácia da fenotipagem.

## **REFERÊNCIAS**

Aiennaka P, Wongkaew A, Chanthaworn J, Nagashima SK, Boonma S, Authapun J, Jenweerawat S, Kongsila P, Kittipadakul P, Nakasathien S, Sreewongchai T, Wannarat W, Vichukit V, Lopez-Lavalle LAB, Ceballos H,

- Rojanaridpiched C, Phumichai C (2012) Molecular Characterization of a spontaneous waxy starch mutation in cassava. *Crop Sci* 52:2121-2130.
- Akinbo O, Gedil M, Ekpo EJA, Oladele J, Dixon AGO (2007) Detection of RAPD markers-linked to resistance to cassava anthracnose disease. *Afr J Biotechnol* 6:677-682.
- Alves-Pereira A, Peroni N, Abreu AG, Gribel R, Clement CR (2011) Genetic STRUCTURE of traditional varieties of bitter manioc in three soils in Central Amazonia. *Genetica* 139:1259-1271.
- Alwala S, Kimbeng CA, Gravois KA, Bischoff KP (2006a) TRAP, a new tool for sugarcane breeding: comparison with AFLP and coefficient of parentage. *Sugar Cane Intern* 26:62-86.
- Alwala S, Suman A, Arro JA, Veremis JC, Kimbeng CA (2006b) Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Sci* 46:448-455.
- Asare PA, Galyuon IKA, Sarfo JK, Tetteh JP (2011) Morphological and molecular based diversity studies of some cassava (*Manihot esculenta* crantz) germplasm in Ghana. *Afr J Biotechnol* 10:13900-13908.
- Barakat MN, Al-Doss AA, Elshafei AA, Ghazy AI, Moustafa KA (2013) Assessment of genetic diversity among wheat doubled haploid plants using TRAP markers and morpho-agronomic traits. *AJCS* 7:104-111.
- Beeching JR, Marmey P, Gavalda M-C, Noirot M, Hayso HR, Hughes MA, Charrier A (1993) An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. *Ann. Botany* 72:515-520.
- Blair MW, Fregene MA, Beebe SE, Ceballos, H (2007) Marker-assisted selection in common beans and cassava. In: Guimarães E, Ruane J, Scherf B, Sonnino A, Dargie A. Marker-assisted selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. (eds.) FAO, Rome. 81-116.
- Chavarriaga-Aguirre P, Halsey, M (2005) Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Reproductive biology and practices for confinement of experimental field trials. Report prepared for the Program for Biosafety Systems. Washington, D.C.: Program for Biosafety Systems

- Chen J, Hu J, Vick BA, Jan CC (2006) Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers. *Theor Appl Genet* 113:122–127.
- Chen X, Xia Z, Fu Y, Lu C, Wang W (2010) Constructing a genetic linkage map using an F1 population of non-inbred parents in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Mol Biol Rept* 28:676–683.
- Colombo C, Second G, Charrier A (2000) Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 23: 189-199.
- Deng Z, Goktepe F, Harbaugh BK (2007) Assessment of genetic diversity and relationships among Caladium cultivars and species using molecular markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 132:219–229.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Elias M, Panaud O, Robert T (2000) Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. *Heredity* 85:219–230.
- Emanuelli F, Lorenzi S, Grzeskowiak L, Catalano V, Stefanini M, Troglio M, Myles S, Martinez-Zapater JM, Zyprian E, Moreira FM, Grando ME (2013) Genetic diversity and population STRUCTURE assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC Plant Biol* 13:39.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611-2620.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164:1567–1587.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7:574-578.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT database. Disponível em <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 31 Junho 2014.



- Ferguson ME, Hearne SJ, Close TJ, Wanamaker S, Moskal WA, Town CD, de Young J, Marri PR, Rabbi IY, de Villiers EP (2012) Identification, validation and high-throughput genotyping of transcribed gene SNPs in cassava. *Theor Appl Genet* 124:685-695.
- Foster JT, Allan GJ, Chan AP, Rabinowicz PD, Ravel J, Jackson PJ, Keim P (2010) Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). *BMC Plant Biol* 10:13.
- Fregene M, Angel F, Gomez R, Rodriguez F, Chavarriaga P, Roca W, Tohme J, Bonierbale M. (1997) A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 95:431-441.
- Fregene M, Bernal A, Duque M, Dixon A, Tohme J (2000) AFLP analysis of African cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) germplasm resistant to the Cassava Mosaic Disease (CMD). *Theor Appl Genet* 100:678–685.
- Fregene MA, Suarez M, Mkumbira J, Kulembeka H, Ndedya E, Kulaya A, Mitchel S, Gullberg U, Rosling H, Ago D, Kresovich S (2003) Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in an asexually propagated crop. *Theor Appl Genet* 107:1083-1093.
- Gibbons A (1990) New view of early Amazonia. *Science* 248:1488-1490.
- Gowda M, Zhao Y, Würschum T, Longin CFH, Miedaner T, Ebmeyer E, Schachschneider R, Kazman E, Schacht J, Martinant J-P, Mette MF, Reif JC (2014) Relatedness severely impacts accuracy of marker-assisted selection for disease resistance in hybrid wheat. *Heredity* 112:552-561
- Hazekamp T (2002) The potential role of passport data in the conservation and use of plant genetic resources. In: Engels JMM, Ramanatha Rao V, Brown AHD and Jackson MT (eds.) *Managing Plant Genetic Diversity*. IPGRI, Rome, Italy. 185-194.
- Hu J, Beiquan M, Vick BA (2007) Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. *Genet Resour Crop Evol* 54:1667-1674.
- Hu J, Vick BA (2003) Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol Biol Rept* 2:289-294.

- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Res* 9:1322-1333.
- Hurtado P, Olsen KM, Buitrago C, Ospina C, Marin J, Duque M, De Vicente C, Wongtiem P, Wenzel P, Killian A, Adeleke M, Fregene M (2008) Comparison of simple sequence repeat (SSR) and diversity array technology (DArT) markers for assessing genetic diversity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Genet. Resour* 6:208-214.
- Kawuki RS, Ferguson M, Labuschagne M, Herselman L, Kim DJ (2009) Identification, characterisation and application of single nucleotide polymorphisms for diversity assessment in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol Breed* 23:669–684.
- Kunkeaw S, Tangphatsornruang S, Smith DR, Triwitayakorn K (2010) Genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on AFLP and SSR markers. *Plant Breed* 129:112–115.
- Kunkeaw S, Yoocha T, Sraphet S, Boonchanawiwat A, Boonseng O, Lightfoot DA, Triwitayakorn K, Tangphatsornruang S (2011) Construction of a genetic linkage map using simple sequence repeat markers from expressed sequence tags for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol Breed* 27:67–75.
- Kwon SJ, Hu J, Coyne CJ (2010) Genetic diversity and relationship among Faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm entries as revealed by TRAP markers. *Plant Genet. Resour. Char. Util.* 8:204-213.
- Lado B, Matus I, Rodriguez A, Inostroza L, Poland J, Belzile F, del Pozo A, Quincke M, von Zitzewitz, J (2013) Increased genomic prediction accuracy through spatial adjustment of field trial data. *G3* 3:2105-2114.
- Laurentin HE, Karlovsky P. (2006) Genetic relationship and diversity in a sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *BMC Genet* 7:10
- Li G, Quiros CF (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor Appl Genet* 103:455-461
- Lokko Y, Anderson JV, Rudd S, Raji A, Horvath D, Mikel MA, Kim R, Liu L, Hernandez A, Dixon AG, Ingelbrecht IL (2007) Characterization of an

- 18,166 EST dataset for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) enriched for drought-responsive genes. *Plant Cell Rep* 26:1605-1618.
- Lopez C, Jorge V, Piegu B, Mba C, Cortes D, Restrepo S, Soto M, Laudie M, Berger C, Cooke R, Delseny M, Tohme J, Verdier V (2004) A unigene catalogue of 5700 expressed genes in cassava. *Plant Mol Biol* 56: 541-554.
- Luo C, Zhang F, Zhang QL, Guo DY, Luo ZR (2013) Characterization and comparison of EST-SSR and TRAP markers for genetic analysis of the Japanese persimmon *Diospyros kaki*. *Genet. Mol. Res* 12:2841-2851
- Marmey P, Beeching J, Hamon S, Charrier A (1993) Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) germplasm using RAPD markers. *Euphytica* 74: 203-209.
- Marsjan PA, Oldenbroek JK (2007) Molecular Markers, a tool for exploring genetic diversity. In: *The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. FAO Research report, Rome, 359-379.
- Menzo V, Giancaspro A, Giove S, Nigro D, Zacheo S, Colasuonno P, Marcotuli I, Incerti O, Blanco A, Gadaleta A (2013) TRAP molecular markers as a system for saturation of the genetic map of durum wheat. *Euphytica* 194:151-160.
- Mezette TF, Blumer CG, Veasey EA (2013) Morphological and molecular diversity among cassava genotypes. *Pesq. agropec. bras.* 48:510-518.
- Moyib OK, Mkumbira J, Odunola AO, Dixon AG (2012) Gene diversity and identification of putative hybridizing parents for root rot resistance in cassava using simple sequence repeats. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 4:47-56.
- Mühlen GS, Martins PS, Ando A (2000) Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. *Sci. Agric.* 57:319-328.
- Olsen KM (2004) SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. *Plant Mol Biol* 6:517–526.
- Olsen KM, Schaal BA (2001) Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, *Euphorbiaceae*) and its wild relatives: Further evidence for a Southern Amazonian origin of domestication. *Am J Bot* 88:131-142.

- Phuthero FG, (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA Polymerase. Nucl. Acids Res. 21:4850-4851.
- Paliwal R, Singh R, Singh AK, Kumar S, Kumar A, Majumdar RS (2013) Molecular Characterization of Giloe (*Tinospora cordifolia* Willd. Miers ex Hook. F. and Thoms.) accessions using Start Codon Targeted (SCoT) markers. Int. J. Med. Arom. Plants 3:413-422.
- Pariyo A, Tukamuhabwa P, Baguma Y, Kawuki RS, Alicai T, Gibson P, Kanju E, Wanjala BW, Harvey J, Nzuki I, Rabbi IY, Ferguson M (2013) Simple sequence repeat (SSR) diversity of cassava in South, East and Central Africa in relation to resistance to cassava brown streak disease. Afr J Biotechnol 12:4453-4464.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6:288-295.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28:2537-2539.
- Pérez-de-Castro AM, Vilanova S, Cañizares J, Pascual L, Blanca JM, Díez MJ, Prohens J, Picó B. (2012) Application of genomic tools in plant breeding. Curr Genomics 13:179–195.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor Appl Genet 98:107–112.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population STRUCTURE using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.
- Rabbi IY, Kulembeka HP, Masumba E, Marri PR, Ferguson M (2012) An EST-derived SNP and SSR genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theor Appl Genet 125: 329–342.
- Raji AA, Anderson JV, Kolade OA, Ugwu CD, Dixon AGO, Ingelbrecht IL (2009a) Gene-based microsatellites for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): prevalence, polymorphisms, and cross-taxa utility. BMC Plant Biol 9:1-11.
- Raji AAJ, Fawole I, Gedil1 M, Dixon AGO (2009b) Genetic differentiation analysis of African cassava (*Manihot esculenta*) landraces and elite

- germplasm using amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers. *Ann Appl Biol* 155:187-199.
- Ramanatha R, Hodgkin T (2002) Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 68:1-19.
- Roa AC, Maya MM, Duque MC, Tohme J, Allem A, Bonierbale MW (1997) AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theor Appl Genet* 95:745–750.
- Rodriguez-Ramilo ST, Toro MA, Caballero A, Fernandez J (2007) The accuracy of a heritability estimator using molecular information. *Conserv. Genet.* 8:1189–1198.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.; Misener, S. (ed.) *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*. P Humana Press, Totowa, NJ. 365-386.
- Sakurai T, Plata G, Rodriguez-Zapata F, Seki M, Salcedo A, Atsushi T, Ishiwata A, Tohme J, Sakaki Y, Shinozaki K, Ishitani M (2007) Sequencing analysis of 20,000 full-length cDNA clones from cassava reveals lineage specific expansions in gene families related to stress response. *BMC Plant Biol* 7:66.
- Schreier AD, Mahardja B, May B (2012) Hierarchical patterns of population STRUCTURE in the endangered Fraser River white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and implications for Conservation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 69:1968–1980.
- Silva RM, Bandel G, Martins OS (2003) Mating system in an experimental garden composed of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) ethnovarieties. *Euphytica* 134:127–135.
- Sraphet S, Boonchanawiwat A, Thanyasiriwat T, Boonseng O, Tabata S, Sasamoto S, Shirasawa K, Isobe S, Lightfoot DA, Tangphatsornruang S, Triwitayakorn K (2011) SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 122:1161–1170.
- Suman A, Ali K, Arro J, Parco AS, Kimbeng CA, Baisakh N (2012) Molecular diversity among members of the saccharum complex assessed using TRAP markers based on lignin-related. *Genes Bio Energy Res* 5:197-205.

- Twito T, Weigend S, Blum S, Granevitze Z, Feldman M, Perl-Treves R, Lavi U, Hillel J (2007) Biodiversity of 20 chicken breeds assessed by SNPs located in gene regions. *Cytogenet. Genome Res.* 117:319-326.
- Vieira EA, Fialho JF, Faleiro FG, Bellon G, Fonseca KG, Carvalho LJCB, Silva MS (2010) Caracterização molecular e variabilidade genética de acessos elite de mandioca para fins industriais. *Cienc. Rural* 40:2467-2471.
- Wang Z, Kang M, Liu H, Gao J, Zhang Z, Li L, Wu R, Pang X (2014) High-level genetic diversity and complex population STRUCTURE of siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) in China as revealed by nuclear SSR markers. *PLoS ONE* 9:2.
- Weir, BS (1990) *Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Xia L, Peng K, Yang S, Wenzl P, de Vicente MC, Fregene M, Kilian A (2005) DArT for high-throughput genotyping of Cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. *Theor Appl Genet* 110:1092-1098.
- Zacarias A, Botha A, Labuschagne M, Benesi I (2004) Characterisation and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) germplasm from Mozambique using RAPD fingerprinting. *Euphytica* 138:49–53.
- Zhang N, Yuan S, Yang W, Liu D (2010) Identification of Lr24 with targeted region amplified polymorphism (TRAP) analysis in wheat. *Front. Agric. China* 4:18–23.
- Zou M, Xia Z, Ling P, Zhang Y, Chen X, Wei Z, Bo W, Wang W (2011) Mining EST-Derived SSR markers to assess genetic diversity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Mol Biol* 29:961-971.

## CAPÍTULO 2

### **SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA AO CASSAVA MOSAIC DISEASE NA CULTURA DA MANDIOCA<sup>4</sup>**

---

<sup>4</sup> O artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico Scientia Agricola

## SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES PARA RESISTÊNCIA AO CASSAVA MOSAIC DISEASE NA CULTURA DA MANDIOCA

**Resumo** - O complexo de geminivirus conhecido como *Cassava Mosaic disease* (CMD) é uma das viroses mais devastadoras da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). O objetivo deste trabalho foi utilizar a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) para identificar potenciais acessos resistentes ao CMD, bem como indicar cruzamentos promissores com variedades elites do Brasil. Foram genotipados 1.274 acessos com cinco marcadores moleculares (NS169, NS158, SSRY028, SSRY040 e RME1) associados à resistência ao CMD, e 402 SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphism*). A indicação dos cruzamentos promissores foi feita com a análise discriminante de componentes principais (ADCP) e com a matriz de parentesco genômico calculadas com marcadores SNPs. Não foram identificados acessos de *M. esculenta* com o gene *CMD1*, descrito em *M. glaziovii*. Por outro lado, observou-se 5,03; 3,58 e 5,12% dos acessos com os marcadores flangeadores do gene *CMD2*: NS169+RME1, NS158+RME1 e SSRY28+RME1, respectivamente. Apenas sete acessos (0,55%) apresentaram todas as marcas relacionadas. A ADCP dos sete acessos juntamente com 17 variedades elite de mandioca indicou a formação de três grupos de divergência. As potenciais fontes de resistência ao CMD foram alocadas em dois grupos, enquanto as variedades elite foram distribuídas nos três grupos. As baixas estimativas de parentesco genômico (variação de -0,167 a 0,681, média de 0,076), contribuíram para o sucesso na identificação de genótipos contrastantes. Dez variedades elite foram indicadas para cruzamento com as fontes de resistência ao CMD. O uso da SAM em países onde o CMD é uma doença quarentenária constitui-se numa estratégia de sucesso, não somente para identificação de acessos resistentes, mas também por orientar os cruzamentos promissores.

**Termos para indexação:** *Manihot esculenta*; melhoramento; doença; virose.



## MOLECULAR-ASSISTED SELECTION FOR RESISTANCE TO CASSAVA MOSAIC DISEASE IN CASSAVA

**Abstract** - The geminiviruses complex known as cassava mosaic disease (CMD) is one of the most devastating viruses for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). The objective of this study was to use molecular-assisted selection (MAS) to identify CMD resistant accessions and indicate promising crosses with Brazilian elite varieties. One thousand and seven hundred twenty-four accessions were genotyped using five molecular markers (NS169, NS158, SSRY028, SSRY040 and RME1) associated with resistance to CMD, along with 402 SNPs (single-nucleotide polymorphism). The promising crosses were pointed out using discriminant analysis of main component (DAPC) and the matrix of genomic relationship estimated with SNPs markers. The *CMD1* gene previously described in *M. glaziovii* was not found in accessions of *M. esculenta*. In contrast, it was found 5.03; 3.58 and 5.12% of cassava accessions with markers flanking the *CMD2* gene: NS169+RME1, NS158+RME1 and SSRY28+RME1, respectively. Only seven accessions (0.55%) presented all markers linked to the CMD resistance. The DAPC of the seven accessions along with 17 cassava elite varieties indicated the formation of three divergent clusters. Potential sources of resistance to CMD were divided into two groups, while the elite varieties were distributed in three groups. The low estimates on genomic relationship (range of -0.167 to 0.681, average of 0.076), contributed to the success in identifying contrasting genotypes. Ten elite varieties were suitable for crossing with the potential sources of resistance to CMD. The use of SAM in countries where the CMD is a quarantine disease constitutes a successful strategy, not only for identifying the resistant accessions, but also for guiding the promising crosses.

**Index terms:** *Manihot esculenta*; breeding; disease; virus.

## INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura com crescente importância no mundo tropical, sendo um produto básico na alimentação de uma parcela da população brasileira, e em alguns países do continente africano, a cultura é considerada de segurança alimentar. A mandioca tem forte presença na África tropical, Ásia e América Latina e é o quarto cultivo mundial mais importante nos países em desenvolvimento, com uma produção estimada em mais de 276 milhões de toneladas em 2013 (FAO 2014). Por outro lado, a produtividade média mundial  $12,88 \text{ t.ha}^{-1}$  é cerca de 6x menor do que o potencial da cultura (Oliveira et al. 2012). Um dos principais fatores que contribuem para esta baixa produtividade na cultura da mandioca é o ataque de doenças.

Dentre as principais doenças da mandioca em nível mundial, sobretudo no continente africano, destacam-se as viroses conhecidas como *Cassava Mosaic disease* – CMD (Legg e Thresh 2000; Legg e Fauquet 2004). O agente causal do CMD está relacionado a várias espécies de *Cassava Mosaic Geminiviruses* – CMGs (família Geminiviridae: Gênero: Begomovirus) e algumas variantes recombinantes (Legg e Fauquet 2004; Bull et al. 2006; Tiendrébéogo et al. 2012).

A doença é caracterizada por sintomas típicos de mosaico, como clorose da folha e posterior deformação diminuindo o crescimento e, por conseguinte a produção da planta (Thresh et al. 1994). O CMD é transmitido pela *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em seus diferentes estádios, bem como pelo uso de material propagativo infectado e por ferramentas de corte comumente utilizadas nos tratamentos culturais da mandioca (De Bruyn et al. 2012). Os prejuízos causados pela doença podem chegar a 100% (Thresh et al. 1994) com estimativas de perdas da produção na África da ordem de US \$440 milhões anuais (Thresh et al. 1997).

Dentre as principais medidas de controle do CMD o uso de variedades resistentes é a solução mais eficaz, porque reduz as perdas de produção causadas pela doença e também reduz a fonte de inóculo nas lavouras especialmente em variedades que suprimem acúmulo de vírus (Rabbi et al. 2014). O complexo de CMGs relacionado ao CMD não foi relatado nas

Américas, embora o inseto vetor esteja presente na região (Herrera Campo et al. 2011). Portanto, mesmo não sendo um problema atual no Brasil, a intensa troca de materiais propagativos entre países e as condições favoráveis ao estabelecimento da virose no Brasil justificam o direcionamento das atividades de pesquisa relacionadas à identificação preventiva de fontes de resistência e ao desenvolvimento de programas de melhoramento genético específicos. Contudo, a proibição quarentenária no Brasil, impede a realização de inoculações artificiais em condições controladas e especialmente em campo visando à identificação de fontes de resistência ao CMD. Por outro lado, sendo uma doença controlada por poucos genes de efeito dominante, é possível implementar a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) visando à seleção indireta de genótipos resistentes na ausência do patógeno. De fato, fontes de resistência contra quase todas as espécies de CMGs foram encontradas em variedades locais na Nigéria e outros países do Oeste Africano na década de 80, sendo denominadas série *Tropical Manihot esculenta* (TME) (Fregene et al. 2001; Akano et al. 2002).

Os primeiros marcadores associados ao CMD foram relatados por Fregene e Puonti-Kaerlas. (2002), que descreveram o microssatélite SSRY40 ligado ao gene *CMD1*. Posteriormente, Akano et al. (2002) identificaram um marcador microssatélite (SSRY28) e um *Restriction Fragment Length Polymorphisms* - RFLP (GY1) flanqueando o locus *CMD2* a 9 e 8 cM de distância, respectivamente. Outros marcadores foram associados ao *CMD2*, como o microssatélite SSRY106 e o *Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP E-ACC/M-CTC (Lokko et al. 2005), o *Sequence-Characterized Amplified Region* - SCAR RME1 (Fregene et al. 2006) e os microssatélites NS158 (Fregene et al. 2006) e NS169 (Okogbenin et al. 2007). Além disso, o marcador microssatélite NS198 foi associado a um terceiro alelo de resistência chamado *CMD3* (Okogbenin et al. 2012). Em função dos resultados destas pesquisas, o uso da SAM para seleção de plantas resistentes ao CMD em populações segregantes de mandioca tem sido relatado na literatura, como uma estratégia importante e rotineira nos programas de melhoramento (Okogbenin et al. 2007; Okogbenin et al. 2012; Ribeiro et al. 2012).

A maioria dos trabalhos relacionados ao desenvolvimento de variedades de mandioca resistentes ao CMD foi realizada em países africanos, sobretudo

por ser uma doença endêmica que ocasiona importantes perdas econômicas. Diante da perspectiva da chegada e estabelecimento da doença no Brasil, é premente a necessidade de direcionar esforços para a identificação preventiva de fontes de resistência, a exemplo do que vem sendo feito na África. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar fontes de resistência ao CMD no germoplasma de mandioca da América Latina, com uso de marcadores moleculares associados à doença, além de sugerir cruzamentos contrastantes com variedades elites para geração de populações segregantes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

A identificação de fontes de resistência ao CMD foi realizada utilizando 1.274 acessos de germoplasma pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, Brasil), procedentes de vários ecossistemas do Brasil, bem como da Colômbia, Venezuela e Nigéria (Suplemento 1). Este banco é formado por variedades locais e melhoradas resultante de procedimentos convencionais de melhoramento, tais como cruzamento e seleção, bem como pela seleção de variedades locais de alto potencial produtivo identificadas por agricultores ou instituições de pesquisa.

A variedade TME-14 descrita pelo *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA) da Nigéria (dados de passaporte disponível em: <http://genebank.iita.org/>), previamente reportada como altamente resistente ao CMD, foi utilizada como testemunha para presença dos fragmentos.

### **DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído segundo protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) conforme metodologia Doyle e Doyle (1987). Com o intuito de avaliar a integridade do DNA e padronizar sua concentração, realizou-se quantificação em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídio (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) por comparação visual com uma série de concentrações de DNA fago Lambda (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### Seleção assistida por marcadores moleculares

Os marcadores moleculares utilizados na SAM para identificação de potenciais fontes de resistência foram um marcador RME1 (Fregene et al. 2006) do tipo SCAR e quatro microssatélites NS158 (Fregene et al. 2006), NS169 (Okogbenin et al. 2012), SSRY28 (Akano et al 2002) e SSRY40 (Mba et al 2001) (Tabela 1), enquanto o mapa de ligação dos marcadores associados ao *CMD2* é apresentado na Figura 1.

**Tabela 1.** Relação e sequência dos iniciadores utilizados na seleção assistida para resistência ao *Cassava Mosaic Disease* (CMD), bem como sua localização no genoma e tamanho do alelo esperado (TAE).

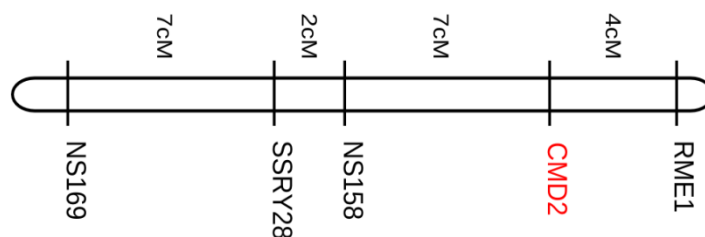
| Gene | Iniciador | Localização (Scaffold) | Sequência do iniciador                            | TAE (pb) |
|------|-----------|------------------------|---|----------|
| CMD1 | SSRY40    | 06352*                 | TGCATCATGGTCCACTCACT                              | 293      |
|      |           |                        | CATTCTTTTTTCGGCATTCCAT                            |          |
| CMD2 | NS158     | 06906**                | GTGCGAAATGGAAATCAATG<br>TGAAATAGTGATACATGCAAAAGGA | 166      |
|      | NS169     | 06906**                | GTGCGAAATGGAAATCAATG<br>GCCTTCTCAGCATATGGAGC      | 319      |
|      | SSRY28    | 05214**                | TTGACATGAGTGATATTTTTCTTGAG<br>GCTGCGTGCAAACTAAAAT | 180      |
|      | RME1      | Não localizado         | ATGTTAATGTAATGAAAGAGC<br>AGAAGAGGGTAGGAGTTATGT    | 700      |

\* De acordo Whankaew et al (2011); \*\*De acordo com Rabbi et al. (2014).

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 15µL contendo 10 ng de DNA, tampão de PCR 1X, 1,5 a 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,2 uM de cada iniciador e 1,0U da Taq DNA Polimerase (Phuthero, 1993). O programa de amplificação consistiu de um ciclo a 94 °C por 5 min; 27 a 30 ciclos a 94 °C por 40 s, 55, 56 ou 58°C por 40 s, 72 °C por 60 s; e extensão final a 72 °C por 5 min em termociclador modelo Veriti® 96-well (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de Agarose 2% p/v (Invitrogen, Carlsbad, CA)

para o marcador RME1 e em gel de Agarose 1000 3% p/v (Invitrogen, Carlsbad, CA) para os marcadores SSRY28, SSRY40, NS169 e NS158. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 0,5x (45 mM Tris-borate, 1,0 mM EDTA) e a visualização dos fragmentos foi feita com uso de brometo de etídeo ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por meio de fotodocumentador (Vilber Lourmat, Marne la Vallée, France). O tamanho dos fragmentos foi determinado visualmente com marcador de peso molecular 50 pb (Ludwig Biotec, Alvorada, Brazil) e 100pb (New England Biolabs, Beverly, MA).

Os acessos de mandioca foram classificados como possuidores dos alelos associados à resistência ao CMD (sendo considerados resistentes - R) ou com amplificação de outros alelos (sendo considerados suscetíveis - S) de acordo com a presença ou ausência, respectivamente, do alelo associado à doença.



**Figura 1.** Mapa de ligação dos marcadores associados ao *CMD2*, adaptado de Akano et al. (2002), Fregene et al. (2006) e Mohan et al. (2013). Os números à acima se referem às distâncias genéticas calculadas em cM= centiMorgan.

### Identificação de contrastes para geração de populações segregantes

Os acessos de germoplasma contendo os alelos relacionados à resistência ao CMD identificados com uso da SAM, juntamente com dois híbridos elite (9624-09 e 98150-06), nove variedades melhoradas (BRS Aipim Brasil, BRS Caipira, BRS Formosa, BRS Guaíra, BRS Kiriris, BRS Mulatinha, BRS Tapioqueira, BRS Verdinha e Equador 72) e seis variedades locais (Baianinha, Cidade Rica, Irará, Lagoa, Mani Branca e Sergipe) foram analisados com dados anteriores de genotipagem de 402 marcadores do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), obtidos por Oliveira et al. (2014).

As informações dos marcadores SNPs foram utilizadas para proceder ao agrupamento dos acessos potencialmente resistentes ao CMD juntamente com

variedades elite com alto potencial produtivo, qualidade de amido, porte de planta adequado ao sistema mecanizado de plantio, e resistência a doenças foliares como antracnose e bacteriose. Este agrupamento tem como objetivo identificar as combinações de parentais mais contrastantes para a geração de populações segregantes visando o desenvolvimento de variedades nacionais com as características agronômicas supracitadas.

A análise discriminante de componentes principais (ADCP) disponível no pacote *adeigenet* para R, versão 3.0.1 (R Development Core Team 2013) foi utilizada para definição dos agrupamentos dos híbridos e variedades elite de mandioca, pois esta técnica não requer uma definição a priori de grupos genéticos (Jombart et al. 2010). Foram utilizados sucessivos agrupamento com o método *K-means* e o Critério de Informação Bayesiano (BIC) para definição do número de grupos, em que *K* com o menor valor BIC representa o número de grupos mais provável para o conjunto de dados em análise. Foram testados valores de *K* de 1 a 10, com 10 corridas para cada *K*. Após definido o número de grupos, foram retidos os eixos da análise de componentes principais que explicam mais de 80% da variância total dos dados.

A matriz de parentesco genômico entre os genótipos de mandioca foi obtida de acordo com vanRaden (2008), na qual  $U = \frac{ZZ'}{2\sum p_i(1-p_i)}$ , em que  $Z = M - P$ , sendo *M* a matriz dos marcadores e *P* a matriz das frequências alélicas expressas por  $2(p_i - 0,5)$ . As estimativas do parentesco genômico foram obtidas com uso da função *kin* do pacote *synbreed* (Wimmer et al. 2012) desenvolvido na plataforma R, versão 3.0.1 (R Development Core Team 2013). Estes dados foram utilizados como uma estratégia auxiliar para indicar os cruzamentos mais contrastantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Implementação da SAM para resistência ao CMD**

Nenhum alelo relacionado ao *CMD1* e associado ao marcador SSRY40 foi encontrado nos acessos de mandioca brasileiros. Este resultado indica ausência de homologia do gene *CMD1* no genoma de *M. esculenta*, tendo em

vista que este gene foi originalmente descoberto na espécie *M. glaziovii* (Jennings 1976). De acordo com os autores, a resistência genética derivada de *M. glaziovii* é do tipo poligênica, com herança recessiva e herdabilidade de 0,60. Híbridos resultantes do cruzamento entre *M. glaziovii* e *M. esculenta* conhecidos como *Tropical Manihot Species* - TMS tem sido utilizados como fonte de resistência ao CMD na África (Legg e Fauquet 2004; Thresh e Cooter 2005), embora os resultados desta introgressão na espécie cultivada não tenham apresentado grande sucesso nos últimos anos (Rabbi et al. 2014).

Em função da ausência de genótipos com o gene *CMD1*, os esforços neste trabalho foram voltados para a identificação de acessos com o gene *CMD2*. O SSRY28 foi o primeiro marcador de herança codominante a ser mapeado próximo do alelo *CMD2* (9 cM) utilizando uma população de mapeamento oriunda do cruzamento entre a variedade local TMe-3 (resistente) e o híbrido TMS30555 (suscetível) (Akano et al. 2002). A variedade TMe-3 é a fonte de original resistência ao CMD, porém no presente trabalho utilizou-se a variedade TMe-14 que é considerada uma duplicata da fonte TMe-3 (Rabbi et al. 2014), cujos resultados da genotipagem confirmaram o tamanho dos alelos relacionados ao gene *CMD2* para todos os marcadores.

A análise individual da presença dos alelos associados ao *CMD2* para os marcadores NS169, NS158, SSRY28 e RME1 demonstrou que 19,29; 15,71; 22,74; e 26,51% dos acessos de mandioca apresentaram os alelos associados à resistência ao CMD (Tabela 2). Por outro lado, a coincidência genotípica dos acessos de mandioca em relação à resistência ao CMD foi bastante variável, de acordo com os marcadores utilizados (Tabela 3).

A coincidência genotípica em relação ao suposto comportamento dos acessos de mandioca foi maior (0,74) para os marcadores NS158 x NS169 e NS158 x SSRY28. A eficiência da SAM depende da proximidade da marca ao gene de interesse, cujas distâncias são estimadas por análise de recombinação gênica. De fato, a distância entre os marcadores NS158 x SSRY28 e NS158 x NS169 é relativamente pequena, i.e., 2 cM (Mohan et al. 2013) e 9 cM (Fregene et al. 2006), respectivamente (Figura 1). Isto certamente contribui para que haja menor taxa de recombinações entre estes marcadores. Além disso, os marcadores NS158 e NS169 estão ancorados no mesmo *scaffold*



(Rabbi et al. 2014), o que reforça a ligação física entre estes marcadores no genoma de *M. esculenta*.

**Tabela 2.** Número de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca que apresentam marcas ligadas ao gene *CMD2* que confere resistência ao *Cassava Mosaic Disease* (CMD).

| Marcadores                    | Genótipos contendo simultaneamente alelos relacionados à resistência |       |
|-------------------------------|--|-------|
|                               | Total  | %     |
| NS169                         | 206  | 19,29 |
| NS158                         | 173  | 15,71 |
| SSRY28                        | 236  | 22,74 |
| RME1                          | 267  | 26,51 |
| NS169 + RME1                  | 61   | 5,03  |
| NS158 + RME1                  | 44   | 3,58  |
| SSRY28 + RME1                 | 62   | 5,12  |
| NS169 + NS158 + RME1          | 9  | 0,71  |
| NS158 + SSRY28 + RME1         | 16   | 1,27  |
| NS169 + NS158 + SSRY28 + RME1 | 7  | 0,55  |

**Tabela 3.** Coincidência de genótipos em relação à presença dos marcadores ligados à resistência ao *Cassava Mosaic Disease* (CMD) nos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca.

| Marcadores | NS169 | NS158 | SSRY28 |
|------------|-------|-------|--------|
| NS158      | 0,74  |       |        |
| SSRY28     | 0,70  | 0,74  |        |
| RME1       | 0,72  | 0,71  | 0,68   |

A combinação RME1 x SSRY28 apresentou a menor coincidência genotípica (0,68), enquanto as combinações NS169 x SSRY28, NS169 x RME1, NS158 x RME1 apresentaram coincidências intermediárias (variação de 0,70 a 0,72) (Tabela 3). Por outro lado, a maior distância genética entre os marcadores NS169 x RME1 (20 cM – Figura 1), tenderia a resultar em menor

coincidência genotípica entre os acessos em função da possibilidade de ocorrência histórica de *crossing-over* entre estes marcadores, porém os resultados demonstraram uma coincidência genotípica mediana (Tabela 3).

Ainda considerando a análise de marcadores individuais, Ribeiro et al. (2012) utilizaram as estratégias de hibridação, seleção assistida por marcadores e avaliações da severidade para o CMD em condições de campo, no programa de melhoramento genético de mandioca de Gana. Estes autores demonstraram que a seleção baseada no marcador NS158 resultou na identificação de um maior número de progênies resistentes em comparação ao SSRY28 e RME1.

Embora relatos de Okogbenin et al. (2007) indiquem que o germoplasma de mandioca da América Latina seja bastante suscetível ao CMD, os resultados do presente trabalho indicam que a percentagem de acessos com possível resistência ao CMD possa chegar a mais de 20%, dependendo do marcador. Isto certamente está em acordo com alta variabilidade genética do germoplasma nacional de mandioca, considerando que o Brasil é o seu centro de origem (Olsen e Schaal 2001).

Adicionalmente, maior acurácia no uso da SAM pode ser obtida com uso de marcadores flanqueando o gene de interesse, considerando a menor chance de recombinação entre os marcadores e o gene de interesse (Collard et al. 2005; Collard e Mackill 2008). Assim, considerando as distâncias genéticas (Figura 1) e a estratégia de seleção simultânea de acessos com base no RME1 e demais marcadores, a acurácia de seleção é de 0,987; 0,993 e 0,994 para as combinações RME1 x NS169, RME1 x SSRY28 e RME1 x NS158, respectivamente.

Ao utilizar esta estratégia, observou-se uma redução de mais de três vezes o número de acessos de mandioca contendo os marcadores associados ao *CMD2*, i.e., 5,03; 3,58 e 5,12% de acessos considerados resistentes para as combinações NS169 + RME1, NS158 + RME1 e SSRY28 + RME1, respectivamente. Por outro lado, a porcentagem de acessos contendo três marcas foi ainda menor, i.e., 0,71 e 1,27%, para NS169 + NS158 + RME1 e NS158 + SSRY28 + RME1, respectivamente. Por fim, a presença dos quatro marcadores foi observada em apenas sete acessos (0,55%) de mandioca (Tabela 2). Genótipos contendo marcas relacionadas ao *CMD2* mostraram-se

resistentes quando avaliados em condições de campo sob infestação natural do patógeno na África (Bi et al. 2010; Okogbenin et al. 2012; Ribeiro et al. 2012) e portanto, a utilização de acessos com mais de um marcador associado ao gene de interesse pode potencializar a seleção de genótipos resistentes em países como o Brasil, na qual o CMD é uma doença quarentenária.

Ao avaliarem progênies BC<sub>1</sub> oriundas de cruzamentos com fontes de resistência ao CMD, Ribeiro et al. (2012) identificaram 82% dos indivíduos com pelo menos um alelo para os marcadores RME1, SSRY28 e NS158, porém apenas 62 indivíduos (28%) apresentaram os três marcadores alelos associados ao gene *CMD2*. Certamente a maior percentagem de indivíduos resistentes ao CMD nesta população BC<sub>1</sub> é devido ao fato de se tratar de populações melhoradas.

A identificação de resistência em 2.490 genótipos oriundos do programa de melhoramento genético do CIAT, com uso dos marcadores RME1 e NS158 e posterior avaliação em condições de campo em uma área com alta pressão da doença na Nigéria revelou que a acurácia de seleção com base nestes dois marcadores variou de 70 a 80%, dependendo das progênies analisadas (Blair et al. 2007). Em outro estudo Okogbenin et al. (2007) fizeram uma primeira introdução de germoplasma da América Latina na África com materiais oriundos de cruzamentos entre parentais elite do programa de melhoramento do CIAT e uma segunda introdução de materiais selecionados com base na SAM (dois microssatélites e seis SCARs) e posterior avaliação dos genótipos em condições de campo sob infestação natural do CMD na Nigéria. No primeiro conjunto de introduções houve um efeito devastador da doença com infecção de 100% das plantas após um mês de plantio. Porém, os resultados da segunda introdução indicaram que a introgressão do gene *CMD2* no germoplasma de mandioca da América Latina via SAM, proporcionou alta resistência em condições de campo, com 67,3% dos genótipos possuindo notas de 1 a 2 (escala de nota na qual 1 = plantas resistentes e 5 = plantas altamente suscetíveis). Portanto, o uso da SAM pode apresentar uma alta eficiência na indicação de genótipos de mandioca com resistência comprovada em condições de campo. Isto certamente se deve à natureza dominante do gene *CMD2* e sua eficácia contra uma ampla gama de cepas virais.

De fato a introdução do gene *CMD2* em germoplasma diversos parece ser a estratégia de controle mais efetivo contra o CMD, uma vez que a incorporação do gene *CMD1* em germoplasma exótico e posterior teste de campo na África indicou que a incorporação do *CMD1* não foi efetiva por se tratar de um gene de efeito menor de natureza quantitativa (Fregene et al. 2006; Okogbenin et al. 2007). Por outro lado, o uso do gene dominante *CMD2* foi bem sucedido na transferência de genes de resistência a genótipos pertencentes à América Latina (Okogbenin et al. 2007).

### ***Análise da diversidade parental disponível para cruzamentos***

Os sete acessos de mandioca (BGM0268, BGM0270, BGM0281, BGM0284, BGM0358, BGM0359 e BGM1370) contendo os alelos relacionados ao *CMD2* para os quatro marcadores tratam-se de variedades locais com adaptação limitada ao seu local de origem e, portanto é preciso gerar populações segregantes a partir de cruzamentos destas fontes de resistência ao CMD com variedades elite nacionais visando o desenvolvimento de variedades adaptadas às principais regiões de cultivo e com características agrônomicas de interesse. Para maximizar a segregação nas progênies, a escolha de parentais deve combinar características contrastantes, muitas vezes inferidos pela divergência genética. Portanto, a análise da divergência dos 24 genótipos com base na análise discriminante de componentes principais (ADCP) e nas matrizes de parentesco genômico podem indicar os cruzamentos mais contrastantes.

O critério de informação bayesiano (BIC), implementado na ADCP, utilizando as sete fontes de resistência ao CMD e as 17 variedades elite brasileiras, indicou que três grupos de diversidade é o número ótimo para descrever a divergência deste conjunto de materiais (Figura 2). Assim, este número de grupos foi utilizado nas análises subsequentes. A ADCP permite identificar estruturas populacionais complexas com atribuição probabilística dos indivíduos em agrupamentos específicos, sem necessitar de pressuposições a respeito do equilíbrio de Hardy-Weinberg ou desequilíbrio de ligação entre os marcadores, minimizando assim a variação dos agrupamentos (Jombart et al. 2010). A ADCP tem sido utilizada para grande volume de dados, especialmente gerados por marcadores do tipo SNP. Recentemente, a ADCP foi utilizada na

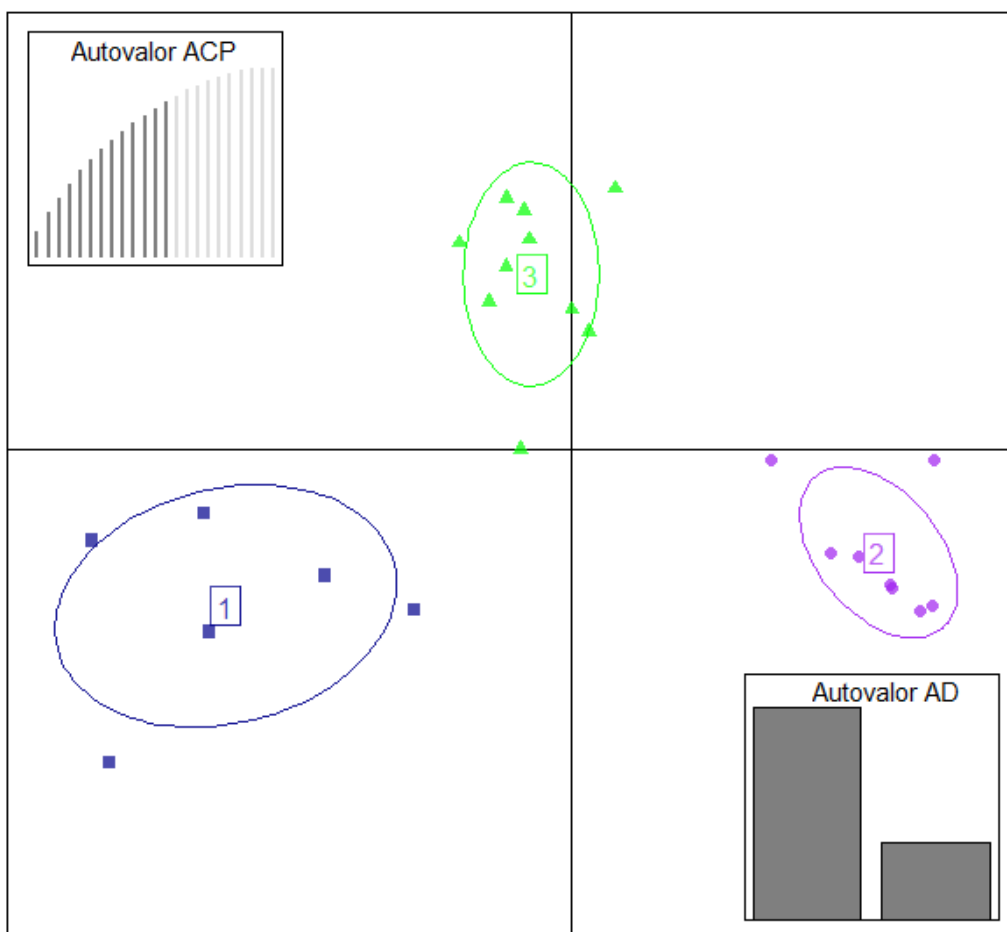
estruturação do germoplasma de *Carica papaya* L. com marcadores microsatélites (Matos et al. 2013) e de mandioca com marcadores SNPs (Oliveira et al. 2014).

Os três grupos de diversidade formados pela ADCP são bastante discrepantes, havendo uma clara separação dos grupos de acordo com a representação das duas primeiras funções lineares (Figura 2). As fontes de resistência ao CMD foram alocadas nos Grupos 1 (BGM0284, BGM0268 e BGM1370) e 2 (BGM0268, BGM0270, BGM0358 e BGM0359). Embora, Rabbi et al. (2014) tenham sugerido que todas as fontes de resistência monogênica na mandioca são derivadas de um único ancestral comum, alguns autores sugerem a existência de outros genes de resistência ao CMD (Bi et al. 2010; Okogbenin et al. 2012). As sete fontes de resistência encontradas no presente trabalho foram claramente alocadas em diferentes grupos de divergência e, portanto indicam a existência de variabilidade genética nestes genótipos não associadas aos locos de resistência, que possivelmente contribuirá para a geração de indivíduos transgressivos a partir dos cruzamentos com as variedades elite. Contudo, não é possível afirmar que se trata de fontes de resistência diferentes daquelas cultivadas na África.

Com relação às variedades elite de mandioca, não houve uma tendência de agrupamento de acordo com o seu grau de melhoramento, pois tanto os híbridos, quanto as variedades melhoradas e variedades locais foram alocadas em diferentes grupos. As variedades BRS Aipim Brasil, BRS Kiriris e Ecuador72 foram agrupadas ao Grupo 1, enquanto o híbrido 9624-09 e as variedades BRS Caipira, BRS Mulatinha e BRS Tapioqueira foram alocadas no Grupo 2. O outro híbrido (98150-06), e as variedades BRS Verdinha, BRS Formosa, BRS Guaira, Baianinha, Mani Branca, Cidade Rica, Irará, Lagoa e Sergipe foram alocadas no Grupo 3 (Figura 3, Tabela 4).

As estimativas de parentesco genômico com base nos marcadores SNPs entre todos os pares de genótipos de mandioca apresentaram variação de -0,167 a 0,681, com média de 0,076 (Figura 3). Os valores negativos de parentesco genômico indicam pares de indivíduos que compartilham poucos alelos em comparação ao esperado com base nas suas frequências alélicas, enquanto valores positivos representam o oposto. Portanto, de modo geral as estimativas obtidas indicam um baixo parentesco entre os indivíduos, o que

certamente contribui para a maximização dos ganhos esperados com a seleção nas populações segregantes a serem geradas.



**Figura 2.** Gráfico de dispersão do primeiro e segundo componente principal da análise discriminante de componentes principais (ADCP) com base na análise de 24 genótipos de mandioca com 402 marcadores do tipo *Single-Nucleotide Polymorphism* (SNP). Os clusters, representados por números e cores diferentes representam os acessos analisados. Os autovalores da análise de componentes principais (ACP) e análise discriminante (AD) também são apresentados.

De acordo com a Figura 3, as maiores estimativas de parentesco genômico foram observadas entre as fontes de resistência ao CMD: BGM0281 x BGM0284 (0,457) e BGM0284 x BGM1370 (0,373); bem como entre 9624-09 x BRS Caipira (0,334), 9624-09 x BRS Tapioqueira (0,666) e BRS Caipira x BRS Tapioqueira (0,324). Isto é condizente com a ADCP, uma vez que todas

estas combinações de genótipos pertencem ao mesmo grupo. Com base nestes resultados, a recomendação de cruzamentos que envolvam estes genótipos não seria indicada.

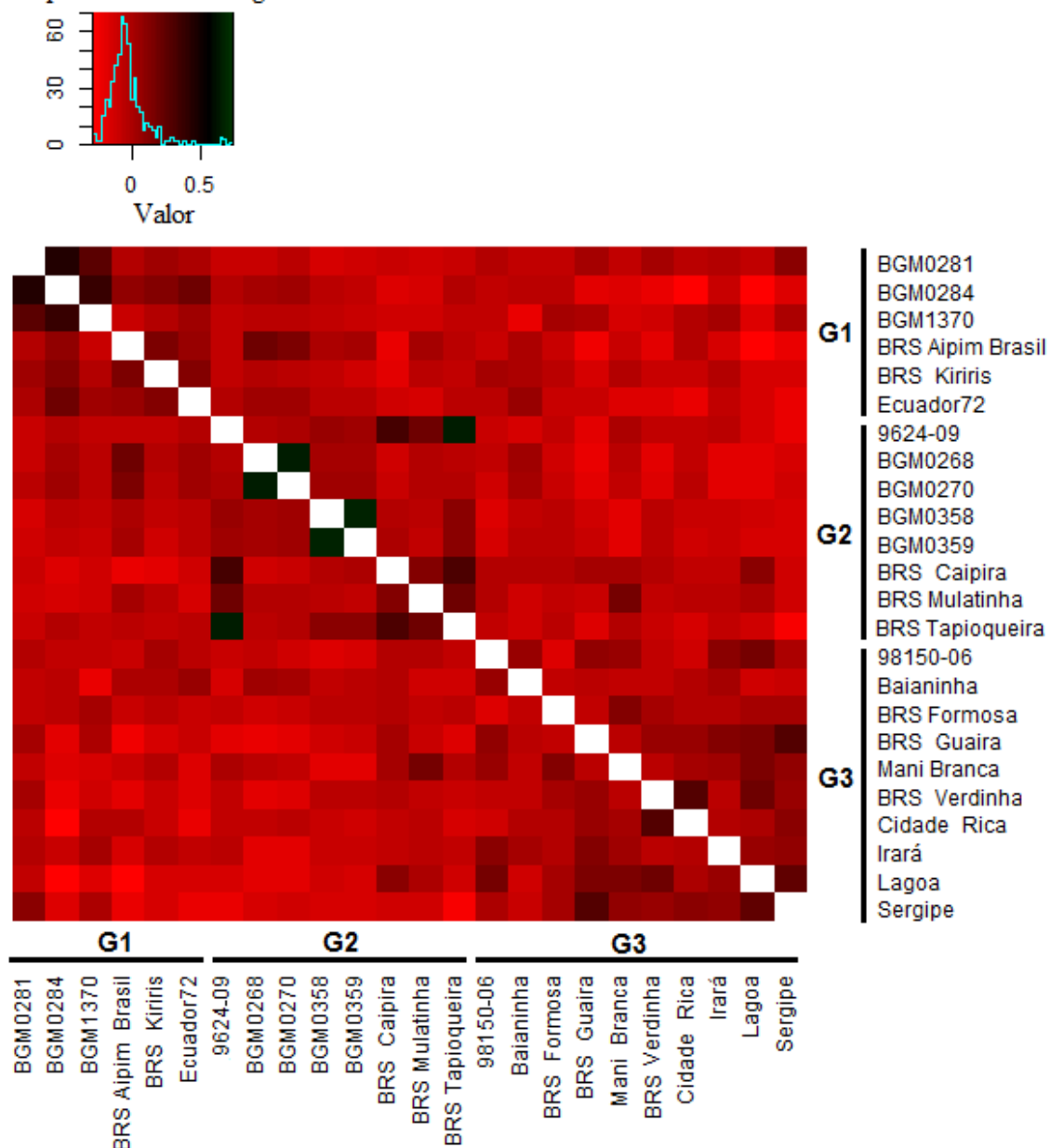
A primeira separação dos acessos de mandioca em três grupos, com base na ADCP dos marcadores SNPs, indicou um nível hierárquico a ser utilizado para direcionamento dos possíveis cruzamentos mais contrastantes com base nas informações moleculares. Portanto, levando-se em consideração os agrupamentos formados pela ADCP, a escolha dos melhores cruzamentos entre as fontes de resistência ao CMD e as variedades elite de mandioca mais plantadas no Brasil foi feita considerando as duas combinações mais contrastantes em relação ao parentesco genômico (Tabela 4).

Para as fontes de resistência BGM0284 e BGM1370, pertencentes ao Grupo 1, as combinações de cruzamentos com menor grau de parentesco foram obtidas entre as variedades do Grupo 3 (Tabela 4). Para o acesso BGM0281, as duas combinações genótípicas mais contrastantes foram aquelas com as variedades BRS Mulatinha (-0,109) e BRS Tapioqueira (-0,094), ambas pertencentes ao Grupo 2. Por outro lado, para a fonte BGM0284, as menores estimativas de parentesco foram obtidas com as variedades Cidade Rica (-0,267) e Lagoa (-0,283), enquanto que para a fonte BGM1370 as melhores combinações foram com as variedades Baianinha (-0,202) e Lagoa (-0,168). Mesmo com grau de parentesco mediano, observou-se que as fontes de resistência BGM0281 e BGM0284 apresentaram menor grau de parentesco com diferentes variedades, o que certamente poderá contribuir para aumentar a variabilidade genética nas populações segregantes, carregando desta forma backgrounds genéticos bastante divergentes.

Para as fontes de resistência ao CMD pertencentes ao Grupo 2 (BGM0268, BGM0270, BGM0358 e BGM0359), observou-se maior complementação (menor grau de parentesco genômico) com as variedades pertencentes ao Grupo 3. As melhores combinações de cruzamentos para a fonte BGM0268 foram observadas entre BRS Guaíra (-0,211) e Lagoa (-0,186), enquanto para BGM0270 foram BRS Guaíra e Irará, ambas com o mesmo grau de parentesco (-0,176). Para a fonte BGM0358, as melhores combinações foram entre o híbrido 98150-06 (-0,166) e a variedade Mani Branca (-0,177).

Por outro lado, as combinações com menor grau de parentesco com a fonte BGM0359 foram Mani Branca (-0,178) e Sergipe (-0,146).

Mapa de cores e histograma



**Figura 3.** Heatmap do parentesco genômico de 24 genótipos de mandioca, com base na análise de 402 marcadores do tipo *Single-Nucleotide Polymorphism* (SNP). Os três agrupamentos formados pela análise discriminante de componentes principais é representada na figura como G1, G2 e G3.



**Tabela 4.** Estimativas de parentesco genômico entre as sete fontes de resistência ao *Cassava Mosaic Disease* (CMD) e as 17 variedades elite de mandioca. Os cruzamentos selecionados para cada fonte de resistência são apresentados em negrito e sublinhados.

| Grupo   | Variedades elite    | Fontes de resistência ao CMD |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|---------|---------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|         |                     | Grupo1                       |                   |                   | Grupo2            |                   |                   |                   |
|         |                     | BGM<br>0281                  | BGM<br>0284       | BGM<br>1370       | BGM<br>0268       | BGM<br>0270       | BGM<br>0358       | BGM<br>0359       |
| 1       | BRS Aipim<br>Brasil | -<br>0,018                   | -<br>0,087        | -<br>0,102        | -<br>0,192        | -<br>0,163        | -<br>0,001        | -<br>0,013        |
|         | BRS Kiriris         | 0,036                        | 0,125             | -<br>0,032        | -<br>0,034        | -<br>0,040        | -<br>0,059        | -<br>0,109        |
|         | Ecuador72           | 0,000                        | 0,210             | 0,037             | 0,034             | 0,045             | -<br>0,047        | -<br>0,048        |
| 2       | 9624-09             | -<br>0,092                   | -<br>0,018        | -<br>0,063        | -<br>0,018        | -<br>0,007        | -<br>0,069        | -<br>0,052        |
|         | BRS Caipira         | -<br>0,089                   | -<br>0,168        | -<br>0,117        | -<br>0,103        | -<br>0,084        | -<br>0,032        | -<br>0,007        |
|         | BRS Mulatinha       | -<br><b>0,109</b>            | -<br>0,131        | -<br>0,112        | -<br>0,034        | -<br>0,032        | -<br>0,035        | -<br>0,077        |
|         | BRS<br>Tapioqueira  | -<br><b>0,094</b>            | -<br>0,012        | -<br>0,065        | -<br>0,036        | -<br>0,025        | -<br>0,123        | -<br>0,106        |
| 3       | 98150-06            | -<br>0,022                   | -<br>0,069        | -<br>0,074        | -<br>0,076        | -<br>0,106        | -<br><b>0,166</b> | -<br>0,143        |
|         | Baianinha           | -<br>0,062                   | -<br>0,053        | -<br><b>0,202</b> | -<br>0,036        | -<br>0,023        | -<br>0,069        | -<br>0,038        |
|         | BRS Formosa         | -<br>0,074                   | -<br>0,049        | -<br>0,027        | -<br>0,104        | -<br>0,094        | -<br>0,049        | -<br>0,043        |
|         | BRS Guáira          | 0,028                        | -<br>0,179        | -<br>0,007        | -<br><b>0,211</b> | -<br><b>0,176</b> | -<br>0,115        | -<br>0,092        |
|         | Mani Branca         | -<br>0,057                   | -<br>0,160        | -<br>0,125        | -<br>0,039        | -<br>0,077        | -<br><b>0,177</b> | -<br><b>0,178</b> |
|         | BRS Verdinha        | 0,018                        | -<br>0,205        | -<br>0,114        | -<br>0,181        | -<br>0,162        | -<br>0,045        | -<br>0,055        |
|         | Cidade Rica         | -<br>0,052                   | -<br><b>0,267</b> | -<br>0,023        | -<br>0,058        | -<br>0,047        | -<br>0,083        | -<br>0,109        |
|         | Irará               | -<br>0,013                   | -<br>0,100        | -<br>0,016        | -<br>0,179        | -<br><b>0,176</b> | -<br>0,100        | -<br>0,093        |
|         | Lagoa               | -<br>0,060                   | -<br><b>0,283</b> | -<br><b>0,168</b> | -<br><b>0,186</b> | -<br>0,175        | -<br>0,115        | -<br>0,125        |
| Sergipe | 0,111               | -<br>0,168                   | 0,004             | -<br>0,135        | -<br>0,109        | -<br>0,128        | -<br><b>0,146</b> |                   |

A utilização de genótipos resistentes é boa estratégia a médio e longo prazo para enfrentar o CMD. Contudo, o desenvolvimento de novas variedades de mandioca não deve ser feito com foco exclusivo na introdução do gene *CMD2*, pois existe uma grande preferência dos agricultores por variedades locais ou melhoradas que atendam a características específicas de qualidade e sabor das raízes (quando destinadas ao consumo *in natura*), bem como pela alta produtividade de amido, quando destinada à indústria de amido.

De fato, existem exemplos clássicos na África, na qual variedades resistentes ao CMD foram rejeitadas por agricultores em Uganda, por apresentarem qualidade inferior das raízes quando comparadas às variedades adaptadas localmente (Kawuki et al. 2011). A introgressão de genes de resistência ao CMD em variedades com características desejáveis se torna crucial para adoção das novas variedades, tal como foi feito por outros autores (Okogbenin et al. 2007; Kawuki et al. 2011; Ribeiro et al. 2012).

Por se tratar de uma espécie heterozigótica, certamente haverá uma alta segregação nas progênes  $F_1$  derivadas dos cruzamentos sugeridos no presente trabalho, resultando na geração de genótipos bastante diferentes dos parentais. Contudo, a recombinação de genes presentes nas variedades elite brasileiras já plantadas pelos agricultores representa um avanço importante na criação de novas variedades com backgrounds genéticos divergentes, porém com características desejáveis e já aceitas pelos agricultores e consumidores.

### ***Perspectivas para o melhoramento da mandioca com vistas à resistência ao CMD***

Atualmente o CMD não ocorre nas Américas, porém o seu principal inseto vetor (mosca branca) já foi relatado nesta região, enquanto sua forma alternativa, o biótipo B (*B. argentifolia*) é de ocorrência generalizada, e de acordo com Polston e Anderson (1997) a sua gama de hospedeiros inclui a mandioca. Portanto, a perspectiva de chegada da doença no Brasil e de uma possível adaptação de alimentação do biótipo B à mandioca, faz com que os programas de melhoramento genético desenvolvam medidas de prevenção. Assim, a incorporação da resistência ao CMD nas variedades brasileiras tem sido um dos objetivos do programa da Embrapa nos últimos anos.

Em se tratando de uma doença quarentenária no Brasil, a SAM constitui uma das únicas formas de se iniciar a identificação de fontes de resistência na ausência do patógeno. Isto é especialmente válido para culturas de ciclo longo (>12 meses), como é o caso da mandioca, na qual são necessários de 8 a 12 anos para o desenvolvimento de uma variedade, utilizando procedimentos convencionais (Okogbenin et al. 2007; Oliveira et al. 2012). No caso específico do melhoramento da mandioca para resistência ao CMD, a SAM foi utilizada para a identificação inicial das fontes de resistência, enquanto os marcadores SNPs foram utilizados para estimação do parentesco dos indivíduos visando à orientação dos cruzamentos. Após a obtenção das populações segregantes  $F_1$ , a SAM será novamente utilizada para identificação dos segregantes com os alelos de resistência ao CMD de forma a reduzir o número de plantas a serem avaliadas na fase de *seedlings* e etapas subsequentes do processo seletivo. Adicionalmente utilizando a SAM o prazo para a detecção dos genótipos resistentes ao CMD é de apenas dois anos (desde o cruzamento até a obtenção das plantas  $F_1$ ), contra os oito anos com base no melhoramento convencional (desde o cruzamento até a realização dos ensaios avançados de resistência e produção). Assim, como a mandioca é uma cultura de propagação vegetativa, o uso da SAM permite que os melhoristas concentrem seus esforços apenas nos genótipos identificados como resistentes nas primeiras fases do programa de melhoramento, cujos genótipos estão fixados, e com isso pode-se reduzir o número de ciclos de avaliação. Esta estratégia certamente trará impactos positivos na redução dos ciclos de seleção e com isso nos custos envolvidos na avaliação dos genótipos em condições de campo, a exemplo do que tem sido realizado em outros programas (Blair et al. 2007; Okogbenin et al. 2007; 2012; Ribeiro et al. 2012).

O melhoramento genético de qualquer cultura depende da extensão da variabilidade genética presente no germoplasma, muito embora historicamente os programas de melhoramento de mandioca utilizam poucos parentais nos cruzamentos, sobretudo em função do desconhecimento do potencial agrônomo e da variação genética disponível. Neste sentido, os resultados obtidos no presente trabalho em relação à identificação de possíveis fontes de resistência ao CMD, juntamente com a indicação de variedades com características desejáveis como resistência a algumas doenças da parte aérea

(BRS Caipira, BRS Mulatinha, BRS Tapioqueira e BRS Formosa) e das raízes (BRS Kiriris, BRS Aipim Brasil e Mani Branca), resistência a ácaros e percevejos (Ecuador72), alta produtividade de raízes e amido (9624-09, 98150-06, Baianinha, Cidade Rica, Irará, Lagoa e Sergipe) e tolerância ao déficit hídrico (BRS Guáira, BRS Verdinha), constituem um grande avanço no direcionamento de cruzamentos específicos. Portanto, espera-se que as estratégias de melhoramento preventivo implementada no programa de melhoramento da Embrapa via SAM possa contribuir para reduzir o número de ciclos de seleção necessários para a transferência dos alelos de resistência ao CMD, bem como gerar novas variedades de mandioca com características desejáveis para a indústria e para o consumo *in natura*.

## REFERÊNCIAS

- Akano, A.O.; Dixon, A.; Mba, C.; Barrera, E.; Fregene, M. 2002. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 521-525.
- Bi, H.; Aileni, M.; Zhang, P. 2010. Evaluation of cassava varieties for cassava mosaic disease resistance jointly by agro-inoculation screening and molecular markers. *African Journal of Plant Science* 4: 330-338.
- Blair, M.W.; Fregene, M.A.; Beebe, S.E.; Ceballos, H. 2007. Marker-assisted selection in common beans and cassava. p.81-115. *In*: Guimarães, E.; Ruane, J.; Scherf, B.; Sonnino, A.; Dargie, J., (eds.) *Marker-assisted selection - Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*. Rome: FAO.
- Bull, S.E.; Briddon, R.W.; Sserubombwe, W.S.; Ngugi, K.; Markham, P.G.; Stanley, J. 2006. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *Journal of General Virology* 87: 3053-3065.
- Collard, B.C.Y.; Jahufer, M.Z.Z.; Brouwer, J.B.; Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.

- Collard, B.C.Y.; Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 557–572.
- De Bruyn, A.; Villemot, J.; Lefeuvre, P.; Villar, E.; Hoareau, M.; Harimalala, M.; Abdoul-Karime, A.L.; Abdou-Chakour, C.; Reynaud, B.; Harkins, G.W.; Varsani, A.; Martin, D.P.; Lett, J. 2012. East African cassava mosaic-like viruses from Africa to Indian ocean islands: molecular diversity, evolutionary history and geographical dissemination of a bipartite begomovirus. *BMC Evolutionary Biology* 12: 228.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- FAO - Food and Agriculture Organization. 2012. FAOSTAT database. FAO, Italy. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> [Acesso em Jan 14, 2014]
- Fregene, M.; Bernal, A.; Duque, M.; Dixon, A.G.O.; Tohme, J. 2000. AFLP analysis of African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm resistant to the cassava mosaic disease (CMD). *Theoretical and Applied Genetics* 100:678-685.
- Fregene, M.; Morante, N.; Sánchez, T.; Marin, J.; Ospina, C.; Barrera, E.; Gutierrez, J.; Guerrero, J.; Bellotti, A.; Santos, L.; Alzate, A.; Moreno, S.; Ceballos, H. 2006. Molecular markers for introgression of useful traits from wild *Manihot* relatives of cassava, marker-assisted selection (MAS) of disease and root quality traits. *Journal of Root Crops* 32:1-31.
- Fregene, M.; Okogbenin, E.; Mba, C.; Angel, F.; Suarez, M.C.; Janneth, G.; Chavarriaga, P.; Roca, W.; Bonierbale, M.; Tohme, J. 2001. Genome mapping in cassava improvement: challenges, achievements and opportunities. *Euphytica* 120:159–165.
- Fregene, M.; Puonti-Kaerlas, J. 2002. Cassava biotechnology. In: R.J. Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti (Eds.), *Cassava: Biology, Production and Utilization*. CABI Publishing, 179–207.

- Herrera Campo, B.V.; Hyman, G.; Bellotti, A. 2011. Threats to cassava production: known and potential geographic distribution of four key biotic constraints. *Food Security* 3:329–345.
- Jennings, D.L. 1976. Breeding for Resistance to African Cassava Mosaic Disease: Progress and Prospects. *In: Interdisciplinary Workshop*. IDRC, Muguga (Kenya).
- Jombart, T.; Devillard, S.; Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically STRUCTURE populations. *BMC Genetics* 11:94.
- Kawuki, R.S.; Pariyo, A.; Amuge, T.; Nuwamanya, E.; Ssemakula, G.; Tumwesigye, S.; Bua, A.; Baguma, Y.; Omongo, C.; Alicai, T.; Orone, J. 2011. A breeding scheme for local adoption of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 3:120-130.
- Legg, J.P.; Fauquet, C.M. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Molecular Biology* 56:585–599.
- Legg, J.P.; Thresh, J.M. 2000 Cassava mosaic virus disease in East Africa: a dynamic disease in a changing environment. *Virus Research* 71:135-149.
- Lokko, Y.; Danquah, E.Y.; Offei, S.K.; Dixon, A.G.O.; Gedil, M.A. 2005. Molecular markers associated with a new source of resistance to the cassava mosaic disease. *African Journal of Biotechnology* 4:873-881.
- Matos, E.L.S.; Oliveira, E.J., Jesus, O.N.; Dantas, J.L.L. 2013. Microsatellite markers of genetic diversity and population STRUCTURE of *Carica papaya*. *Annals of Applied Biology* 163:298–310.
- Mba, R.E.C.; Stephenson, P.; Edwards, K.; Melzer, S.; Nkumbira, J.; Gullberg, U.; Apel, K.; Gale, M.; Tohme, J.; Fregene, M. 2001 Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 21–31.
- Mohan, C.; Shanmugasundaram, P.; Maheswaran, M.; Senthil, N.; Raghu, D.; Unnikrishnan, M. 2013. Mapping new genetic markers associated with CMD

- resistance in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using simple sequence repeat markers. *Journal of Agricultural Science* 5: 57-65.
- Okogbenin, E.; Egesi, C.N.; Olanmi, B.; Ogundapo, O.; Kahya, S.; Hurtado, P.; Marin, J.; Akinbo, O.; Mba, C.; Gomez, H.; de Vicente, C.; Baiyeri, S.; Uguru, M.; Ewa, F.; Fregene, M. 2012. Molecular marker analysis and validation of resistance to cassava mosaic disease in elite cassava genotypes in Nigeria. *Crop Science* 52:2576-2586.
- Okogbenin, E.; Porto, M.C.M.; Egesi, C.; Mba, C.; Ospinosa, E.; Santos, L.G.; Ospina, C.; Marin, J.; Barera, E.; Gutierrez, J.; Ekanayake, I.; Iglesias, C.; Fregene, M. 2007. Marker aided introgression of CMD resistance in Latin American germplasm for genetic improvement of cassava in Africa. *Crop Science* 47:1895-1904.
- Oliveira, E.J.; Ferreira, C.F.; Santos, V.S.; Jesus, O.N.; Oliveira, G.A.F.; Silva, M.S. 2014. Potential of SNP markers for the characterization of Brazilian cassava germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 127:1423-1440.
- Oliveira, E.J.; Resende, M.D.V.; Santos, V.S.; Ferreira, C.F.; Oliveira, G.A.F.; Silva, M.S.; Oliveira, L.A.; Aguilar-Vildoso, C.A. 2012. Genome-wide selection in cassava. *Euphytica* 187:263-276.
- Olsen, K.M.; Schaal, B.A. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88:131-142.
- Phuthero, F.G. 1993. Rapid purification of high-activity Taq DNA Polymerase. *Nucleic Acids Research* 21:4850-4851.
- Polston, J.P.; Anderson, P.K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted Gemini viruses in tomato in the Western hemisphere. *Plant Disease* 81:1358-1369.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>

- Rabbi, I.Y.; Hamblin M. T.; Kumar, P.L.; Gedil, M.A.; Ikpan, A.S.; Jean-Luc Jannink; Kulakow, P.A. 2014. High-resolution mapping of resistance to cassava mosaic geminiviruses in cassava using genotyping-by-sequencing and its implications for breeding. *Virus Research* 186:87-96.
- Ribeiro, P.F.; Akromah, R.; Manu-Aduening, J. 2012. Using marker assisted selection to hasten screening of cassava cultivars developed through introgression of Cassava Mosaic Disease (CMD) resistance into cassava landraces in Ghana. *Journal of Agricultural Science and Technology B* 2:74-80.
- Thresh, J.M.; Cooter, R.J. 2005. Strategies for controlling cassava mosaic virus disease in Africa. *Plant Pathology* 54:587-614.
- Thresh, J.M.; Fargette, D.; Otim-Nape, G.W. 1994. Effects of African cassava mosaic geminivirus on the yield of cassava. *Tropical Science* 34:26-42.
- Thresh, J.M.; Otim-Nape, G.W.; Legg, J.P.; Fargette, D. 1997. African cassava mosaic virus disease: The magnitude of the problem. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2:13-18.
- Tiendrébéogo, F.; Lefeuvre, P.; Hoareau, M.; Harimalala, M.A.; De Bruyn, A.; Villemot, J.; SE Traoré, V.; Konaté, G.; Traoré, A.S.; Barro, N.; Reynaud, B.; Traoré, O.; Lett, J. 2012. Evolution of African cassava mosaic virus by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. *Virology Journal*. 9:67.
- VanRaden, P. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of Dairy Science* 91:4414-4423.
- Wimmer V.; Albrecht, T.; Auinger, H-J.; Schön, C-C. 2012. synbreed: a framework for the analysis of genomic prediction data using R. *Bioinformatics* 28:2086-2087
- Whankaew, S.; Poopear, S.; Kanjanawattanawong, S.; Tangphatsornruang, S.; Boonseng, O.; Lightfoot, D.A.; Triwitayakorn, K. 2011. A genome scan for quantitative trait loci affecting cyanogenic potential of cassava root in an outbred population. *BMC Genomics* 12:266.



## SUPLEMENTO

**Suplemento 1:** Relação de indivíduos utilizados na genotipagem com os marcadores RME1, NS158, NS169, SSRY028 e SSRY040 relacionados ao gene que confere resistência ao mosaico africano, pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Manihot esculenta* Crantz da Embrapa Mandioca e Fruticultura e respectivo local de origem.

| N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local  |
|-----|---------|--------|-----|---------|--------|-----|---------|--------|-----|---------|--------|
| 1   | BGM0003 | Brasil | 15  | BGM0022 | Brasil | 29  | BGM0038 | SE/BR  | 43  | BGM0053 | BA/BR  |
| 2   | BGM0004 | BA/BR  | 16  | BGM0023 | BA/BR  | 30  | BGM0040 | BA/BR  | 44  | BGM0054 | PA/BR  |
| 3   | BGM0005 | MG/BR  | 17  | BGM0024 | SE/BR  | 31  | BGM0041 | Brasil | 45  | BGM0056 | SE/BR  |
| 4   | BGM0006 | MG/BR  | 18  | BGM0025 | BA/BR  | 32  | BGM0042 | BA/BR  | 46  | BGM0057 | Brasil |
| 5   | BGM0007 | BA/BR  | 19  | BGM0027 | Brasil | 33  | BGM0043 | MG/BR  | 47  | BGM0058 | Brasil |
| 6   | BGM0009 | BA/BR  | 20  | BGM0028 | BA/BR  | 34  | BGM0044 | Brasil | 48  | BGM0060 | Brasil |
| 7   | BGM0010 | BA/BR  | 21  | BGM0029 | BA/BR  | 35  | BGM0045 | Brasil | 49  | BGM0061 | PA/BR  |
| 8   | BGM0011 | BA/BR  | 22  | BGM0030 | Brasil | 36  | BGM0046 | SP/BR  | 50  | BGM0062 | BA/BR  |
| 9   | BGM0014 | BA/BR  | 23  | BGM0031 | BA/BR  | 37  | BGM0047 | BA/BR  | 51  | BGM0064 | BA/BR  |
| 10  | BGM0016 | BA/BR  | 24  | BGM0032 | RN/BR  | 38  | BGM0048 | BA/BR  | 52  | BGM0065 | BA/BR  |
| 11  | BGM0018 | Brasil | 25  | BGM0033 | BA/BR  | 39  | BGM0049 | Brasil | 53  | BGM0066 | PA/BR  |
| 12  | BGM0019 | PA/BR  | 26  | BGM0035 | RN/BR  | 40  | BGM0050 | BA/BR  | 54  | BGM0067 | PA/BR  |
| 13  | BGM0020 | SP/BR  | 27  | BGM0036 | BA/BR  | 41  | BGM0051 | BA/BR  | 55  | BGM0069 | BA/BR  |
| 14  | BGM0021 | PA/BR  | 28  | BGM0037 | Brasil | 42  | BGM0052 | Brasil | 56  | BGM0070 | PA/BR  |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local  |
|-----|---------|--------|-----|---------|--------|-----|---------|--------|-----|---------|--------|
| 57  | BGM0071 | NR     | 80  | BGM0104 | BA/BR  | 103 | BGM0136 | BA/BR  | 126 | BGM0164 | BA/BR  |
| 58  | BGM0072 | BA/BR  | 81  | BGM0106 | SE/BR  | 104 | BGM0137 | BA/BR  | 127 | BGM0165 | Brasil |
| 59  | BGM0073 | BA/BR  | 82  | BGM0109 | BA/BR  | 105 | BGM0138 | BA/BR  | 128 | BGM0166 | BA/BR  |
| 60  | BGM0074 | BA/BR  | 83  | BGM0113 | BA/BR  | 106 | BGM0140 | BA/BR  | 129 | BGM0167 | BA/BR  |
| 61  | BGM0075 | Brasil | 84  | BGM0115 | BA/BR  | 107 | BGM0143 | Brasil | 130 | BGM0168 | BA/BR  |
| 62  | BGM0076 | BA/BR  | 85  | BGM0116 | BA/BR  | 108 | BGM0144 | BA/BR  | 131 | BGM0169 | BA/BR  |
| 63  | BGM0078 | BA/BR  | 86  | BGM0117 | SE/BR  | 109 | BGM0145 | BA/BR  | 132 | BGM0170 | Brasil |
| 64  | BGM0080 | PE/BR  | 87  | BGM0118 | SE/BR  | 110 | BGM0146 | BA/BR  | 133 | BGM0171 | Brasil |
| 65  | BGM0082 | SC/BR  | 88  | BGM0119 | SE/BR  | 111 | BGM0148 | BA/BR  | 134 | BGM0173 | SE/BR  |
| 66  | BGM0083 | BA/BR  | 89  | BGM0120 | BA/BR  | 112 | BGM0149 | RJ/BR  | 135 | BGM0174 | BA/BR  |
| 67  | BGM0084 | BA/BR  | 90  | BGM0121 | BA/BR  | 113 | BGM0150 | BA/BR  | 136 | BGM0175 | BA/BR  |
| 68  | BGM0085 | SE/BR  | 91  | BGM0122 | PA/BR  | 114 | BGM0151 | BA/BR  | 137 | BGM0177 | SP/BR  |
| 69  | BGM0087 | SE/BR  | 92  | BGM0123 | BA/BR  | 115 | BGM0152 | BA/BR  | 138 | BGM0178 | BA/BR  |
| 70  | BGM0088 | BA/BR  | 93  | BGM0124 | Brasil | 116 | BGM0153 | BA/BR  | 139 | BGM0179 | BA/BR  |
| 71  | BGM0089 | Brasil | 94  | BGM0126 | BA/BR  | 117 | BGM0154 | Brasil | 140 | BGM0181 | BA/BR  |
| 72  | BGM0090 | BA/BR  | 95  | BGM0127 | BA/BR  | 118 | BGM0155 | BA/BR  | 141 | BGM0182 | BA/BR  |
| 73  | BGM0091 | RN/BR  | 96  | BGM0128 | MG/BR  | 119 | BGM0156 | BA/BR  | 142 | BGM0183 | Brasil |
| 74  | BGM0093 | Brasil | 97  | BGM0130 | BA/BR  | 120 | BGM0157 | Brasil | 143 | BGM0184 | BA/BR  |
| 75  | BGM0094 | BA/BR  | 98  | BGM0131 | PA/BR  | 121 | BGM0158 | BA/BR  | 144 | BGM0185 | BA/BR  |
| 76  | BGM0096 | BA/BR  | 99  | BGM0132 | PA/BR  | 122 | BGM0160 | BA/BR  | 145 | BGM0186 | BA/BR  |
| 77  | BGM0097 | BA/BR  | 100 | BGM0133 | BA/BR  | 123 | BGM0161 | BA/BR  | 146 | BGM0187 | BA/BR  |
| 78  | BGM0098 | Brasil | 101 | BGM0134 | BA/BR  | 124 | BGM0162 | BA/BR  | 147 | BGM0188 | BA/BR  |
| 79  | BGM0100 | BA/BR  | 102 | BGM0135 | BA/BR  | 125 | BGM0163 | BA/BR  | 148 | BGM0189 | RN/BR  |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local    | N.º | Acessos | Local    |
|-----|---------|-------|-----|---------|--------|-----|---------|----------|-----|---------|----------|
| 149 | BGM0190 | BA/BR | 172 | BGM0232 | BA/BR  | 195 | BGM0268 | BA/BR    | 218 | BGM0297 | Colômbia |
| 150 | BGM0194 | RJ/BR | 173 | BGM0235 | SP/BR  | 196 | BGM0269 | SE/BR    | 219 | BGM0298 | Colômbia |
| 151 | BGM0196 | BA/BR | 174 | BGM0236 | SP/BR  | 197 | BGM0270 | BA/BR    | 220 | BGM0303 | Colômbia |
| 152 | BGM0199 | SP/BR | 175 | BGM0237 | BA/BR  | 198 | BGM0271 | BA/BR    | 221 | BGM0304 | Colômbia |
| 153 | BGM0201 | BA/BR | 176 | BGM0238 | Brasil | 199 | BGM0273 | BA/BR    | 222 | BGM0306 | Colômbia |
| 154 | BGM0202 | BA/BR | 177 | BGM0239 | Brasil | 200 | BGM0276 | SP/BR    | 223 | BGM0307 | Colômbia |
| 155 | BGM0204 | BA/BR | 178 | BGM0240 | BA/BR  | 201 | BGM0277 | SE/BR    | 224 | BGM0308 | SP/BR    |
| 156 | BGM0205 | BA/BR | 179 | BGM0241 | Brasil | 202 | BGM0278 | NR       | 225 | BGM0310 | Colômbia |
| 157 | BGM0206 | BA/BR | 180 | BGM0242 | BA/BR  | 203 | BGM0279 | BA/BR    | 226 | BGM0312 | Colômbia |
| 158 | BGM0207 | BA/BR | 181 | BGM0245 | NR     | 204 | BGM0280 | SE/BR    | 227 | BGM0316 | Colômbia |
| 159 | BGM0208 | BA/BR | 182 | BGM0246 | NR     | 205 | BGM0281 | BA/BR    | 228 | BGM0318 | Colômbia |
| 160 | BGM0209 | SP/BR | 183 | BGM0247 | Brasil | 206 | BGM0282 | BA/BR    | 229 | BGM0319 | Colômbia |
| 161 | BGM0210 | BA/BR | 184 | BGM0248 | BA/BR  | 207 | BGM0283 | Brasil   | 230 | BGM0323 | Colômbia |
| 162 | BGM0211 | SP/BR | 185 | BGM0249 | BA/BR  | 208 | BGM0284 | BA/BR    | 231 | BGM0324 | Colômbia |
| 163 | BGM0212 | BA/BR | 186 | BGM0250 | BA/BR  | 209 | BGM0285 | Brasil   | 232 | BGM0326 | Colômbia |
| 164 | BGM0213 | BA/BR | 187 | BGM0254 | BA/BR  | 210 | BGM0286 | Brasil   | 233 | BGM0327 | Colômbia |
| 165 | BGM0214 | SP/BR | 188 | BGM0257 | BA/BR  | 211 | BGM0287 | Brasil   | 234 | BGM0330 | Colômbia |
| 166 | BGM0215 | RJ/BR | 189 | BGM0260 | SE/BR  | 212 | BGM0288 | BA/BR    | 235 | BGM0331 | Colômbia |
| 167 | BGM0216 | RJ/BR | 190 | BGM0261 | BA/BR  | 213 | BGM0289 | Colômbia | 236 | BGM0332 | Colômbia |
| 168 | BGM0217 | BA/BR | 191 | BGM0263 | BA/BR  | 214 | BGM0290 | Colômbia | 237 | BGM0336 | Colômbia |
| 169 | BGM0220 | BA/BR | 192 | BGM0264 | BA/BR  | 215 | BGM0291 | Colômbia | 238 | BGM0337 | Colômbia |
| 170 | BGM0222 | BA/BR | 193 | BGM0265 | BA/BR  | 216 | BGM0294 | Colômbia | 239 | BGM0338 | Colômbia |
| 171 | BGM0226 | BA/BR | 194 | BGM0266 | BA/BR  | 217 | BGM0295 | Colômbia | 240 | BGM0340 | Colômbia |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local     | N.º | Acessos | Local    | N.º | Acessos | Local    | N.º | Acessos | Local  |
|-----|---------|-----------|-----|---------|----------|-----|---------|----------|-----|---------|--------|
| 241 | BGM0341 | Colômbia  | 264 | BGM0378 | CE/BR    | 287 | BGM0414 | SP/BR    | 310 | BGM0444 | SP/BR  |
| 242 | BGM0342 | Colômbia  | 265 | BGM0380 | CE/BR    | 288 | BGM0419 | Brasil   | 311 | BGM0445 | Brasil |
| 243 | BGM0343 | Venezuela | 266 | BGM0382 | CE/BR    | 289 | BGM0420 | Brasil   | 312 | BGM0447 | Brasil |
| 244 | BGM0345 | Colômbia  | 267 | BGM0383 | CE/BR    | 290 | BGM0421 | SP/BR    | 313 | BGM0448 | RJ/BR  |
| 245 | BGM0349 | Colômbia  | 268 | BGM0386 | CE/BR    | 291 | BGM0422 | SP/BR    | 314 | BGM0449 | Brasil |
| 246 | BGM0352 | SP/BR     | 269 | BGM0388 | ES/BR    | 292 | BGM0423 | Brasil   | 315 | BGM0451 | NR     |
| 247 | BGM0356 | SP/BR     | 270 | BGM0389 | RJ/BR    | 293 | BGM0425 | Colômbia | 316 | BGM0452 | Brasil |
| 248 | BGM0357 | SP/BR     | 271 | BGM0390 | ES/BR    | 294 | BGM0426 | Brasil   | 317 | BGM0454 | RJ/BR  |
| 249 | BGM0358 | BA/BR     | 272 | BGM0393 | ES/BR    | 295 | BGM0427 | Brasil   | 318 | BGM0455 | ES/BR  |
| 250 | BGM0359 | BA/BR     | 273 | BGM0394 | RJ/BR    | 296 | BGM0428 | Brasil   | 319 | BGM0460 | Brasil |
| 251 | BGM0360 | Colômbia  | 274 | BGM0395 | ES/BR    | 297 | BGM0431 | NR       | 320 | BGM0461 | RJ/BR  |
| 252 | BGM0361 | Brasil    | 275 | BGM0396 | ES/BR    | 298 | BGM0432 | Brasil   | 321 | BGM0462 | Brasil |
| 253 | BGM0362 | Brasil    | 276 | BGM0398 | RJ/BR    | 299 | BGM0433 | Brasil   | 322 | BGM0463 | Brasil |
| 254 | BGM0364 | CE/BR     | 277 | BGM0399 | ES/BR    | 300 | BGM0434 | Brasil   | 323 | BGM0464 | MG/BR  |
| 255 | BGM0365 | CE/BR     | 278 | BGM0400 | ES/BR    | 301 | BGM0435 | Brasil   | 324 | BGM0465 | NR     |
| 256 | BGM0366 | Brasil    | 279 | BGM0405 | ES/BR    | 302 | BGM0436 | RJ/BR    | 325 | BGM0467 | PA/BR  |
| 257 | BGM0367 | CE/BR     | 280 | BGM0406 | ES/BR    | 303 | BGM0437 | Brasil   | 326 | BGM0468 | RJ/BR  |
| 258 | BGM0369 | CE/BR     | 281 | BGM0407 | SP/BR    | 304 | BGM0438 | Brasil   | 327 | BGM0469 | Brasil |
| 259 | BGM0371 | CE/BR     | 282 | BGM0408 | Brasil   | 305 | BGM0439 | Brasil   | 328 | BGM0470 | Brasil |
| 260 | BGM0374 | Brasil    | 283 | BGM0409 | Brasil   | 306 | BGM0440 | SP/BR    | 329 | BGM0471 | Brasil |
| 261 | BGM0375 | CE/BR     | 284 | BGM0410 | Colômbia | 307 | BGM0441 | RS/BR    | 330 | BGM0472 | RJ/BR  |
| 262 | BGM0376 | CE/BR     | 285 | BGM0411 | Brasil   | 308 | BGM0442 | SP/BR    | 331 | BGM0473 | Brasil |
| 263 | BGM0377 | Brasil    | 286 | BGM0413 | MG/BR    | 309 | BGM0443 | Brasil   | 332 | BGM0474 | Brasil |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local     | N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local    |
|-----|---------|--------|-----|---------|-----------|-----|---------|--------|-----|---------|----------|
| 333 | BGM0475 | Brasil | 356 | BGM0509 | MG/BR     | 379 | BGM0545 | AL/BR  | 402 | BGM0576 | PE/BR    |
| 334 | BGM0477 | SP/BR  | 357 | BGM0510 | MG/BR     | 380 | BGM0546 | AL/BR  | 403 | BGM0579 | PE/BR    |
| 335 | BGM0478 | Brasil | 358 | BGM0511 | Brasil    | 381 | BGM0547 | PE/BR  | 404 | BGM0583 | AL/BR    |
| 336 | BGM0479 | NR     | 359 | BGM0512 | MG/BR     | 382 | BGM0549 | PE/BR  | 405 | BGM0587 | PE/BR    |
| 337 | BGM0480 | Brasil | 360 | BGM0514 | Brasil    | 383 | BGM0550 | BA/BR  | 406 | BGM0589 | Brasil   |
| 338 | BGM0484 | Brasil | 361 | BGM0515 | Brasil    | 384 | BGM0551 | PA/BR  | 407 | BGM0590 | PE/BR    |
| 339 | BGM0488 | Brasil | 362 | BGM0517 | MG/BR     | 385 | BGM0552 | AL/BR  | 408 | BGM0591 | RS/BR    |
| 340 | BGM0489 | Brasil | 363 | BGM0520 | MG/BR     | 386 | BGM0555 | Brasil | 409 | BGM0592 | RS/BR    |
| 341 | BGM0491 | Brasil | 364 | BGM0521 | RJ/BR     | 387 | BGM0556 | BA/BR  | 410 | BGM0593 | RS/BR    |
| 342 | BGM0492 | Brasil | 365 | BGM0523 | MG/BR     | 388 | BGM0557 | SP/BR  | 411 | BGM0594 | RS/BR    |
| 343 | BGM0494 | RJ/BR  | 366 | BGM0527 | ES/BR     | 389 | BGM0558 | SE/BR  | 412 | BGM0598 | RS/BR    |
| 344 | BGM0495 | RJ/BR  | 367 | BGM0529 | Brasil    | 390 | BGM0560 | PE/BR  | 413 | BGM0600 | RS/BR    |
| 345 | BGM0496 | ES/BR  | 368 | BGM0532 | Venezuela | 391 | BGM0561 | PE/BR  | 414 | BGM0601 | Colômbia |
| 346 | BGM0497 | BA/BR  | 369 | BGM0533 | NR        | 392 | BGM0562 | BA/BR  | 415 | BGM0603 | Colômbia |
| 347 | BGM0498 | Brasil | 370 | BGM0536 | BA/BR     | 393 | BGM0563 | BA/BR  | 416 | BGM0606 | CE/BR    |
| 348 | BGM0499 | Brasil | 371 | BGM0537 | CE/BR     | 394 | BGM0564 | CE/BR  | 417 | BGM0607 | Brasil   |
| 349 | BGM0500 | MG/BR  | 372 | BGM0538 | CE/BR     | 395 | BGM0565 | BA/BR  | 418 | BGM0608 | AC/BR    |
| 350 | BGM0501 | MG/BR  | 373 | BGM0539 | PE/BR     | 396 | BGM0567 | PA/BR  | 419 | BGM0609 | CE/BR    |
| 351 | BGM0503 | MG/BR  | 374 | BGM0540 | AL/BR     | 397 | BGM0569 | BA/BR  | 420 | BGM0610 | CE/BR    |
| 352 | BGM0504 | Brasil | 375 | BGM0541 | BA/BR     | 398 | BGM0570 | PE/BR  | 421 | BGM0611 | CE/BR    |
| 353 | BGM0505 | MG/BR  | 376 | BGM0542 | PB/BR     | 399 | BGM0573 | PR/BR  | 422 | BGM0613 | CE/BR    |
| 354 | BGM0507 | MT/BR  | 377 | BGM0543 | Brasil    | 400 | BGM0574 | PE/BR  | 423 | BGM0614 | SP/BR    |
| 355 | BGM0508 | RJ/BR  | 378 | BGM0544 | PE/BR     | 401 | BGM0575 | Brasil | 424 | BGM0615 | CE/BR    |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local    | N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local  |
|-----|---------|--------|-----|---------|----------|-----|---------|-------|-----|---------|--------|
| 425 | BGM0618 | CE/BR  | 448 | BGM0650 | CE/BR    | 471 | BGM0678 | MA/BR | 494 | BGM0729 | BA/BR  |
| 426 | BGM0619 | CE/BR  | 449 | BGM0651 | Brasil   | 472 | BGM0679 | MA/BR | 495 | BGM0733 | ES/BR  |
| 427 | BGM0620 | CE/BR  | 450 | BGM0654 | Brasil   | 473 | BGM0680 | MA/BR | 496 | BGM0737 | ES/BR  |
| 428 | BGM0623 | CE/BR  | 451 | BGM0655 | CE/BR    | 474 | BGM0682 | ES/BR | 497 | BGM0741 | ES/BR  |
| 429 | BGM0624 | CE/BR  | 452 | BGM0656 | CE/BR    | 475 | BGM0685 | MA/BR | 498 | BGM0745 | Brasil |
| 430 | BGM0625 | CE/BR  | 453 | BGM0657 | MT/BR    | 476 | BGM0693 | MA/BR | 499 | BGM0752 | ES/BR  |
| 431 | BGM0626 | SP/BR  | 454 | BGM0658 | Colômbia | 477 | BGM0694 | MA/BR | 500 | BGM0756 | ES/BR  |
| 432 | BGM0629 | CE/BR  | 455 | BGM0659 | MA/BR    | 478 | BGM0695 | MA/BR | 501 | BGM0759 | NR     |
| 433 | BGM0630 | CE/BR  | 456 | BGM0660 | MA/BR    | 479 | BGM0697 | MA/BR | 502 | BGM0760 | ES/BR  |
| 434 | BGM0631 | Brasil | 457 | BGM0661 | RS/BR    | 480 | BGM0700 | MA/BR | 503 | BGM0767 | BA/BR  |
| 435 | BGM0634 | SP/BR  | 458 | BGM0662 | MA/BR    | 481 | BGM0702 | AC/BR | 504 | BGM0776 | BA/BR  |
| 436 | BGM0635 | CE/BR  | 459 | BGM0664 | MA/BR    | 482 | BGM0703 | AC/BR | 505 | BGM0777 | BA/BR  |
| 437 | BGM0636 | CE/BR  | 460 | BGM0665 | MA/BR    | 483 | BGM0706 | NR    | 506 | BGM0778 | BA/BR  |
| 438 | BGM0638 | CE/BR  | 461 | BGM0666 | Colômbia | 484 | BGM0707 | BA/BR | 507 | BGM0779 | BA/BR  |
| 439 | BGM0639 | SP/BR  | 462 | BGM0667 | RS/BR    | 485 | BGM0708 | AC/BR | 508 | BGM0780 | BA/BR  |
| 440 | BGM0640 | CE/BR  | 463 | BGM0668 | MG/BR    | 486 | BGM0711 | AC/BR | 509 | BGM0781 | BA/BR  |
| 441 | BGM0641 | CE/BR  | 464 | BGM0669 | MA/BR    | 487 | BGM0713 | AC/BR | 510 | BGM0783 | BA/BR  |
| 442 | BGM0642 | CE/BR  | 465 | BGM0670 | RJ/BR    | 488 | BGM0714 | BA/BR | 511 | BGM0785 | BA/BR  |
| 443 | BGM0644 | BA/BR  | 466 | BGM0671 | MA/BR    | 489 | BGM0715 | AC/BR | 512 | BGM0788 | BA/BR  |
| 444 | BGM0645 | CE/BR  | 467 | BGM0672 | MA/BR    | 490 | BGM0717 | AC/BR | 513 | BGM0790 | BA/BR  |
| 445 | BGM0646 | CE/BR  | 468 | BGM0673 | MA/BR    | 491 | BGM0718 | AC/BR | 514 | BGM0791 | BA/BR  |
| 446 | BGM0648 | CE/BR  | 469 | BGM0675 | MA/BR    | 492 | BGM0726 | BA/BR | 515 | BGM0793 | BA/BR  |
| 447 | BGM0649 | CE/BR  | 470 | BGM0677 | MA/BR    | 493 | BGM0728 | BA/BR | 516 | BGM0799 | BA/BR  |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local    | N.º | Acessos | Local    |
|-----|---------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|----------|-----|---------|----------|
| 517 | BGM0800 | BA/BR | 540 | BGM0830 | SE/BR | 563 | BGM0867 | BA/BR    | 586 | BGM0895 | PA/BR    |
| 518 | BGM0803 | AL/BR | 541 | BGM0831 | SE/BR | 564 | BGM0868 | BA/BR    | 587 | BGM0896 | PA/BR    |
| 519 | BGM0805 | AL/BR | 542 | BGM0832 | SE/BR | 565 | BGM0869 | BA/BR    | 588 | BGM0898 | PA/BR    |
| 520 | BGM0806 | AL/BR | 543 | BGM0834 | SE/BR | 566 | BGM0870 | Colômbia | 589 | BGM0900 | Colômbia |
| 521 | BGM0807 | AL/BR | 544 | BGM0837 | SE/BR | 567 | BGM0872 | AP/BR    | 590 | BGM0901 | CE/BR    |
| 522 | BGM0808 | AL/BR | 545 | BGM0838 | SE/BR | 568 | BGM0873 | Colômbia | 591 | BGM0902 | PA/BR    |
| 523 | BGM0809 | AL/BR | 546 | BGM0841 | SE/BR | 569 | BGM0875 | MA/BR    | 592 | BGM0903 | PA/BR    |
| 524 | BGM0810 | AL/BR | 547 | BGM0842 | SE/BR | 570 | BGM0876 | PA/BR    | 593 | BGM0904 | Colômbia |
| 525 | BGM0812 | AL/BR | 548 | BGM0843 | SE/BR | 571 | BGM0877 | Colômbia | 594 | BGM0905 | PE/BR    |
| 526 | BGM0813 | AL/BR | 549 | BGM0845 | SE/BR | 572 | BGM0878 | AM/BR    | 595 | BGM0906 | Colômbia |
| 527 | BGM0814 | AL/BR | 550 | BGM0846 | SE/BR | 573 | BGM0879 | SC/BR    | 596 | BGM0907 | AM/BR    |
| 528 | BGM0815 | AL/BR | 551 | BGM0847 | SE/BR | 574 | BGM0880 | AP/BR    | 597 | BGM0908 | Colômbia |
| 529 | BGM0816 | AL/BR | 552 | BGM0848 | SE/BR | 575 | BGM0882 | Colômbia | 598 | BGM0909 | PA/BR    |
| 530 | BGM0817 | AL/BR | 553 | BGM0849 | SE/BR | 576 | BGM0884 | Colômbia | 599 | BGM0912 | Brasil   |
| 531 | BGM0818 | SE/BR | 554 | BGM0850 | SE/BR | 577 | BGM0885 | Colômbia | 600 | BGM0913 | AC/BR    |
| 532 | BGM0819 | SE/BR | 555 | BGM0851 | SE/BR | 578 | BGM0886 | AM/BR    | 601 | BGM0914 | PA/BR    |
| 533 | BGM0820 | SE/BR | 556 | BGM0854 | BA/BR | 579 | BGM0887 | Colômbia | 602 | BGM0915 | PB/BR    |
| 534 | BGM0821 | SE/BR | 557 | BGM0856 | SE/BR | 580 | BGM0888 | SP/BR    | 603 | BGM0917 | PA/BR    |
| 535 | BGM0822 | SE/BR | 558 | BGM0857 | SE/BR | 581 | BGM0889 | TO/BR    | 604 | BGM0918 | PA/BR    |
| 536 | BGM0823 | SE/BR | 559 | BGM0858 | PB/BR | 582 | BGM0890 | Colômbia | 605 | BGM0919 | AM/BR    |
| 537 | BGM0824 | SE/BR | 560 | BGM0859 | PB/BR | 583 | BGM0892 | MG/BR    | 606 | BGM0920 | AM/BR    |
| 538 | BGM0826 | SE/BR | 561 | BGM0863 | MG/BR | 584 | BGM0893 | AM/BR    | 607 | BGM0922 | BA/BR    |
| 539 | BGM0829 | SE/BR | 562 | BGM0866 | BA/BR | 585 | BGM0894 | Colômbia | 608 | BGM0923 | BA/BR    |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local    | N.º | Acessos | Local |
|-----|---------|--------|-----|---------|-------|-----|---------|----------|-----|---------|-------|
| 609 | BGM0924 | BA/BR  | 632 | BGM0952 | AM/BR | 655 | BGM0978 | AM/BR    | 678 | BGM1026 | BA/BR |
| 610 | BGM0925 | Brasil | 633 | BGM0953 | AM/BR | 656 | BGM0979 | AM/BR    | 679 | BGM1027 | BA/BR |
| 611 | BGM0927 | Brasil | 634 | BGM0954 | AM/BR | 657 | BGM0980 | AM/BR    | 680 | BGM1028 | BA/BR |
| 612 | BGM0928 | Brasil | 635 | BGM0955 | AM/BR | 658 | BGM0981 | AM/BR    | 681 | BGM1029 | BA/BR |
| 613 | BGM0929 | Brasil | 636 | BGM0956 | AM/BR | 659 | BGM0982 | AM/BR    | 682 | BGM1030 | NR    |
| 614 | BGM0930 | PR/BR  | 637 | BGM0957 | PA/BR | 660 | BGM0983 | AM/BR    | 683 | BGM1031 | BA/BR |
| 615 | BGM0931 | SP/BR  | 638 | BGM0958 | AM/BR | 661 | BGM0984 | AM/BR    | 684 | BGM1034 | TO/BR |
| 616 | BGM0932 | AL/BR  | 639 | BGM0959 | AM/BR | 662 | BGM0985 | AM/BR    | 685 | BGM1037 | TO/BR |
| 617 | BGM0934 | BA/BR  | 640 | BGM0960 | AM/BR | 663 | BGM0986 | AM/BR    | 686 | BGM1040 | PI/BR |
| 618 | BGM0935 | BA/BR  | 641 | BGM0961 | AM/BR | 664 | BGM0987 | AM/BR    | 687 | BGM1041 | PI/BR |
| 619 | BGM0936 | BA/BR  | 642 | BGM0962 | AM/BR | 665 | BGM0989 | AM/BR    | 688 | BGM1042 | CE/BR |
| 620 | BGM0937 | BA/BR  | 643 | BGM0963 | AM/BR | 666 | BGM0992 | AM/BR    | 689 | BGM1043 | PI/BR |
| 621 | BGM0940 | PA/BR  | 644 | BGM0965 | AM/BR | 667 | BGM0993 | AM/BR    | 690 | BGM1044 | CE/BR |
| 622 | BGM0941 | AM/BR  | 645 | BGM0966 | AM/BR | 668 | BGM0994 | AM/BR    | 691 | BGM1050 | RN/BR |
| 623 | BGM0942 | AM/BR  | 646 | BGM0967 | AM/BR | 669 | BGM0995 | Colômbia | 692 | BGM1053 | RN/BR |
| 624 | BGM0943 | AM/BR  | 647 | BGM0968 | AM/BR | 670 | BGM0996 | Colômbia | 693 | BGM1057 | RN/BR |
| 625 | BGM0944 | AM/BR  | 648 | BGM0971 | AM/BR | 671 | BGM0998 | Colômbia | 694 | BGM1060 | RN/BR |
| 626 | BGM0945 | AM/BR  | 649 | BGM0972 | AM/BR | 672 | BGM1010 | Brasil   | 695 | BGM1061 | RN/BR |
| 627 | BGM0946 | AM/BR  | 650 | BGM0973 | AM/BR | 673 | BGM1012 | SC/BR    | 696 | BGM1062 | RN/BR |
| 628 | BGM0947 | AM/BR  | 651 | BGM0974 | AM/BR | 674 | BGM1015 | SC/BR    | 697 | BGM1065 | PB/BR |
| 629 | BGM0948 | AM/BR  | 652 | BGM0975 | AM/BR | 675 | BGM1023 | BA/BR    | 698 | BGM1067 | RN/BR |
| 630 | BGM0949 | AM/BR  | 653 | BGM0976 | AM/BR | 676 | BGM1024 | BA/BR    | 699 | BGM1073 | RN/BR |
| 631 | BGM0951 | AM/BR  | 654 | BGM0977 | AM/BR | 677 | BGM1025 | BA/BR    | 700 | BGM1077 | PB/BR |



## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local  | N.º | Acessos | Local  |
|-----|---------|--------|-----|---------|-------|-----|---------|--------|-----|---------|--------|
| 701 | BGM1078 | PB/BR  | 724 | BGM1115 | NR    | 747 | BGM1141 | AM/BR  | 770 | BGM1177 | Brasil |
| 702 | BGM1079 | PB/BR  | 725 | BGM1116 | BA/BR | 748 | BGM1142 | AM/BR  | 771 | BGM1178 | Brasil |
| 703 | BGM1080 | BA/BR  | 726 | BGM1118 | BA/BR | 749 | BGM1143 | MT/BR  | 772 | BGM1179 | PB/BR  |
| 704 | BGM1081 | PE/BR  | 727 | BGM1119 | TO/BR | 750 | BGM1144 | AM/BR  | 773 | BGM1180 | Brasil |
| 705 | BGM1082 | PB/BR  | 728 | BGM1120 | RN/BR | 751 | BGM1146 | AM/BR  | 774 | BGM1182 | PA/BR  |
| 706 | BGM1083 | PE/BR  | 729 | BGM1121 | RN/BR | 752 | BGM1148 | BA/BR  | 775 | BGM1183 | AC/BR  |
| 707 | BGM1085 | BA/BR  | 730 | BGM1122 | PB/BR | 753 | BGM1150 | BA/BR  | 776 | BGM1184 | Brasil |
| 708 | BGM1087 | BA/BR  | 731 | BGM1123 | BA/BR | 754 | BGM1152 | AM/BR  | 777 | BGM1185 | AM/BR  |
| 709 | BGM1088 | BA/BR  | 732 | BGM1124 | BA/BR | 755 | BGM1155 | Brasil | 778 | BGM1186 | PA/BR  |
| 710 | BGM1091 | RN/BR  | 733 | BGM1125 | RO/BR | 756 | BGM1156 | NR     | 779 | BGM1188 | Brasil |
| 711 | BGM1093 | MT/BR  | 734 | BGM1126 | BA/BR | 757 | BGM1158 | Brasil | 780 | BGM1189 | PA/BR  |
| 712 | BGM1094 | MT/BR  | 735 | BGM1127 | BA/BR | 758 | BGM1159 | Brasil | 781 | BGM1190 | PA/BR  |
| 713 | BGM1099 | MT/BR  | 736 | BGM1128 | BA/BR | 759 | BGM1160 | PA/BR  | 782 | BGM1191 | PA/BR  |
| 714 | BGM1100 | MT/BR  | 737 | BGM1130 | RN/BR | 760 | BGM1161 | PA/BR  | 783 | BGM1193 | BA/BR  |
| 715 | BGM1101 | MT/BR  | 738 | BGM1131 | SP/BR | 761 | BGM1162 | Brasil | 784 | BGM1194 | Brasil |
| 716 | BGM1102 | MT/BR  | 739 | BGM1132 | AM/BR | 762 | BGM1163 | Brasil | 785 | BGM1195 | Brasil |
| 717 | BGM1103 | Brasil | 740 | BGM1133 | AM/BR | 763 | BGM1164 | Brasil | 786 | BGM1196 | PA/BR  |
| 718 | BGM1105 | BA/BR  | 741 | BGM1134 | AM/BR | 764 | BGM1165 | PA/BR  | 787 | BGM1197 | PA/BR  |
| 719 | BGM1106 | BA/BR  | 742 | BGM1135 | AM/BR | 765 | BGM1167 | Brasil | 788 | BGM1198 | AP/BR  |
| 720 | BGM1107 | BA/BR  | 743 | BGM1136 | AM/BR | 766 | BGM1168 | Brasil | 789 | BGM1200 | BA/BR  |
| 721 | BGM1108 | SC/BR  | 744 | BGM1137 | AM/BR | 767 | BGM1171 | PA/BR  | 790 | BGM1202 | BA/BR  |
| 722 | BGM1110 | SC/BR  | 745 | BGM1139 | AM/BR | 768 | BGM1174 | Brasil | 791 | BGM1203 | BA/BR  |
| 723 | BGM1111 | SC/BR  | 746 | BGM1140 | AM/BR | 769 | BGM1175 | Brasil | 792 | BGM1206 | BA/BR  |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local    | N.º | Acessos | Local   | N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local |
|-----|---------|----------|-----|---------|---------|-----|---------|-------|-----|---------|-------|
| 793 | BGM1207 | BA/BR    | 816 | BGM1254 | Nigéria | 839 | BGM1286 | PE/BR | 862 | BGM1318 | PE/BR |
| 794 | BGM1208 | NR       | 817 | BGM1255 | Nigéria | 840 | BGM1287 | PE/BR | 863 | BGM1319 | PE/BR |
| 795 | BGM1209 | PA/BR    | 818 | BGM1257 | Nigéria | 841 | BGM1288 | PE/BR | 864 | BGM1321 | PE/BR |
| 796 | BGM1210 | PA/BR    | 819 | BGM1259 | Nigéria | 842 | BGM1291 | PE/BR | 865 | BGM1323 | PE/BR |
| 797 | BGM1211 | AM/BR    | 820 | BGM1261 | PE/BR   | 843 | BGM1292 | PE/BR | 866 | BGM1324 | PE/BR |
| 798 | BGM1212 | Brasil   | 821 | BGM1262 | PE/BR   | 844 | BGM1293 | PE/BR | 867 | BGM1325 | PE/BR |
| 799 | BGM1214 | Brasil   | 822 | BGM1263 | PE/BR   | 845 | BGM1294 | PE/BR | 868 | BGM1327 | PB/BR |
| 800 | BGM1217 | Brasil   | 823 | BGM1265 | PE/BR   | 846 | BGM1295 | PE/BR | 869 | BGM1328 | PB/BR |
| 801 | BGM1218 | Brasil   | 824 | BGM1267 | PE/BR   | 847 | BGM1296 | PE/BR | 870 | BGM1330 | PB/BR |
| 802 | BGM1219 | Brasil   | 825 | BGM1268 | PE/BR   | 848 | BGM1297 | PE/BR | 871 | BGM1332 | PB/BR |
| 803 | BGM1220 | Brasil   | 826 | BGM1269 | PE/BR   | 849 | BGM1298 | PE/BR | 872 | BGM1333 | PB/BR |
| 804 | BGM1222 | Brasil   | 827 | BGM1270 | PE/BR   | 850 | BGM1300 | PE/BR | 873 | BGM1335 | PE/BR |
| 805 | BGM1223 | Brasil   | 828 | BGM1273 | PE/BR   | 851 | BGM1303 | PE/BR | 874 | BGM1338 | PE/BR |
| 806 | BGM1224 | Brasil   | 829 | BGM1274 | PE/BR   | 852 | BGM1305 | PE/BR | 875 | BGM1339 | PE/BR |
| 807 | BGM1227 | Brasil   | 830 | BGM1275 | PE/BR   | 853 | BGM1306 | PE/BR | 876 | BGM1342 | PE/BR |
| 808 | BGM1236 | Colômbia | 831 | BGM1277 | PE/BR   | 854 | BGM1308 | CE/BR | 877 | BGM1344 | PB/BR |
| 809 | BGM1243 | Colômbia | 832 | BGM1279 | PE/BR   | 855 | BGM1309 | CE/BR | 878 | BGM1345 | PB/BR |
| 810 | BGM1245 | Nigéria  | 833 | BGM1280 | PE/BR   | 856 | BGM1310 | CE/BR | 879 | BGM1347 | PB/BR |
| 811 | BGM1248 | Nigéria  | 834 | BGM1281 | PE/BR   | 857 | BGM1311 | PE/BR | 880 | BGM1348 | PB/BR |
| 812 | BGM1249 | Nigéria  | 835 | BGM1282 | PE/BR   | 858 | BGM1313 | PE/BR | 881 | BGM1350 | PB/BR |
| 813 | BGM1251 | Nigéria  | 836 | BGM1283 | PE/BR   | 859 | BGM1314 | PE/BR | 882 | BGM1352 | PB/BR |
| 814 | BGM1252 | Nigéria  | 837 | BGM1284 | PE/BR   | 860 | BGM1316 | PE/BR | 883 | BGM1353 | PB/BR |
| 815 | BGM1253 | Nigéria  | 838 | BGM1285 | PE/BR   | 861 | BGM1317 | PE/BR | 884 | BGM1354 | PB/BR |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local | N.º | Acessos | Local  |
|-----|---------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|-------|-----|---------|--------|
| 885 | BGM1355 | PB/BR | 908 | BGM1382 | PB/BR | 931 | BGM1412 | RN/BR | 954 | BGM1448 | Brasil |
| 886 | BGM1356 | PB/BR | 909 | BGM1383 | PB/BR | 932 | BGM1413 | RN/BR | 955 | BGM1450 | PR/BR  |
| 887 | BGM1357 | PB/BR | 910 | BGM1386 | RN/BR | 933 | BGM1414 | RN/BR | 956 | BGM1451 | PR/BR  |
| 888 | BGM1358 | PB/BR | 911 | BGM1387 | RN/BR | 934 | BGM1415 | RN/BR | 957 | BGM1452 | PR/BR  |
| 889 | BGM1360 | PB/BR | 912 | BGM1388 | RN/BR | 935 | BGM1416 | RN/BR | 958 | BGM1453 | PR/BR  |
| 890 | BGM1361 | PB/BR | 913 | BGM1389 | RN/BR | 936 | BGM1417 | RN/BR | 959 | BGM1454 | PR/BR  |
| 891 | BGM1362 | PB/BR | 914 | BGM1390 | RN/BR | 937 | BGM1419 | RN/BR | 960 | BGM1455 | PR/BR  |
| 892 | BGM1363 | PB/BR | 915 | BGM1392 | RN/BR | 938 | BGM1420 | RN/BR | 961 | BGM1456 | MT/BR  |
| 893 | BGM1364 | PB/BR | 916 | BGM1393 | RN/BR | 939 | BGM1422 | RN/BR | 962 | BGM1457 | BA/BR  |
| 894 | BGM1365 | PB/BR | 917 | BGM1395 | RN/BR | 940 | BGM1423 | PE/BR | 963 | BGM1458 | AP/BR  |
| 895 | BGM1366 | PB/BR | 918 | BGM1396 | RN/BR | 941 | BGM1428 | PE/BR | 964 | BGM1465 | BA/BR  |
| 896 | BGM1367 | PB/BR | 919 | BGM1397 | RN/BR | 942 | BGM1429 | PE/BR | 965 | BGM1466 | Brasil |
| 897 | BGM1368 | PB/BR | 920 | BGM1398 | RN/BR | 943 | BGM1432 | PE/BR | 966 | BGM1468 | Brasil |
| 898 | BGM1369 | PB/BR | 921 | BGM1399 | RN/BR | 944 | BGM1434 | PE/BR | 967 | BGM1470 | BA/BR  |
| 899 | BGM1370 | PB/BR | 922 | BGM1400 | RN/BR | 945 | BGM1436 | PE/BR | 968 | BGM1471 | BA/BR  |
| 900 | BGM1371 | PB/BR | 923 | BGM1401 | RN/BR | 946 | BGM1437 | PE/BR | 969 | BGM1472 | BA/BR  |
| 901 | BGM1373 | PB/BR | 924 | BGM1402 | RN/BR | 947 | BGM1439 | BA/BR | 970 | BGM1473 | BA/BR  |
| 902 | BGM1374 | PB/BR | 925 | BGM1403 | RN/BR | 948 | BGM1440 | BA/BR | 971 | BGM1474 | BA/BR  |
| 903 | BGM1375 | PB/BR | 926 | BGM1406 | RN/BR | 949 | BGM1441 | BA/BR | 972 | BGM1475 | BA/BR  |
| 904 | BGM1376 | PB/BR | 927 | BGM1407 | RN/BR | 950 | BGM1442 | BA/BR | 973 | BGM1476 | BA/BR  |
| 905 | BGM1377 | PB/BR | 928 | BGM1408 | RN/BR | 951 | BGM1444 | PA/BR | 974 | BGM1477 | BA/BR  |
| 906 | BGM1378 | PB/BR | 929 | BGM1409 | RN/BR | 952 | BGM1446 | BA/BR | 975 | BGM1479 | BA/BR  |
| 907 | BGM1381 | PB/BR | 930 | BGM1410 | RN/BR | 953 | BGM1447 | BA/BR | 976 | BGM1480 | BA/BR  |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º | Acessos | Local | N.º  | Acessos | Local | N.º  | Acessos | Local | N.º  | Acessos | Local |
|-----|---------|-------|------|---------|-------|------|---------|-------|------|---------|-------|
| 977 | BGM1481 | BA/BR | 1000 | BGM1510 | BA/BR | 1023 | BGM1541 | NR    | 1046 | BGM1583 | PI/BR |
| 978 | BGM1482 | BA/BR | 1001 | BGM1511 | BA/BR | 1024 | BGM1543 | BA/BR | 1047 | BGM1584 | PI/BR |
| 979 | BGM1483 | BA/BR | 1002 | BGM1512 | BA/BR | 1025 | BGM1545 | BA/BR | 1048 | BGM1585 | PI/BR |
| 980 | BGM1484 | BA/BR | 1003 | BGM1513 | BA/BR | 1026 | BGM1546 | BA/BR | 1049 | BGM1589 | PI/BR |
| 981 | BGM1485 | BA/BR | 1004 | BGM1515 | BA/BR | 1027 | BGM1547 | BA/BR | 1050 | BGM1590 | PI/BR |
| 982 | BGM1486 | BA/BR | 1005 | BGM1516 | BA/BR | 1028 | BGM1549 | NR    | 1051 | BGM1593 | PI/BR |
| 983 | BGM1487 | BA/BR | 1006 | BGM1517 | BA/BR | 1029 | BGM1550 | BA/BR | 1052 | BGM1594 | PI/BR |
| 984 | BGM1488 | BA/BR | 1007 | BGM1518 | BA/BR | 1030 | BGM1551 | NR    | 1053 | BGM1595 | PI/BR |
| 985 | BGM1489 | BA/BR | 1008 | BGM1519 | BA/BR | 1031 | BGM1552 | BA/BR | 1054 | BGM1596 | PI/BR |
| 986 | BGM1490 | BA/BR | 1009 | BGM1520 | BA/BR | 1032 | BGM1559 | BA/BR | 1055 | BGM1597 | PI/BR |
| 987 | BGM1491 | BA/BR | 1010 | BGM1521 | BA/BR | 1033 | BGM1560 | BA/BR | 1056 | BGM1598 | PI/BR |
| 988 | BGM1492 | BA/BR | 1011 | BGM1523 | BA/BR | 1034 | BGM1561 | BA/BR | 1057 | BGM1599 | PI/BR |
| 989 | BGM1494 | BA/BR | 1012 | BGM1524 | BA/BR | 1035 | BGM1562 | BA/BR | 1058 | BGM1601 | PI/BR |
| 990 | BGM1495 | BA/BR | 1013 | BGM1525 | BA/BR | 1036 | BGM1563 | PI/BR | 1059 | BGM1602 | PI/BR |
| 991 | BGM1496 | BA/BR | 1014 | BGM1526 | BA/BR | 1037 | BGM1566 | PI/BR | 1060 | BGM1603 | PI/BR |
| 992 | BGM1497 | BA/BR | 1015 | BGM1527 | BA/BR | 1038 | BGM1567 | PI/BR | 1061 | BGM1604 | PI/BR |
| 993 | BGM1498 | BA/BR | 1016 | BGM1532 | BA/BR | 1039 | BGM1569 | PI/BR | 1062 | BGM1605 | PI/BR |
| 994 | BGM1499 | BA/BR | 1017 | BGM1533 | BA/BR | 1040 | BGM1572 | NR    | 1063 | BGM1606 | PI/BR |
| 995 | BGM1501 | BA/BR | 1018 | BGM1534 | BA/BR | 1041 | BGM1573 | PI/BR | 1064 | BGM1607 | PI/BR |
| 996 | BGM1502 | BA/BR | 1019 | BGM1535 | BA/BR | 1042 | BGM1575 | NR    | 1065 | BGM1608 | PI/BR |
| 997 | BGM1503 | BA/BR | 1020 | BGM1537 | BA/BR | 1043 | BGM1576 | PI/BR | 1066 | BGM1609 | PI/BR |
| 998 | BGM1507 | BA/BR | 1021 | BGM1539 | BA/BR | 1044 | BGM1579 | PI/BR | 1067 | BGM1610 | PI/BR |
| 999 | BGM1508 | BA/BR | 1022 | BGM1540 | BA/BR | 1045 | BGM1581 | PI/BR | 1068 | BGM1611 | PI/BR |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º  | Acessos | Local | N.º  | Acessos | Local | N.º  | Acessos | Local | N.º  | Acessos | Local |
|------|---------|-------|------|---------|-------|------|---------|-------|------|---------|-------|
| 1069 | BGM1613 | PI/BR | 1092 | BGM1638 | PA/BR | 1115 | BGM1672 | PA/BR | 1138 | BGM1700 | AM/BR |
| 1070 | BGM1614 | PI/BR | 1093 | BGM1639 | AL/BR | 1116 | BGM1674 | PA/BR | 1139 | BGM1701 | AM/BR |
| 1071 | BGM1615 | PI/BR | 1094 | BGM1640 | BA/BR | 1117 | BGM1675 | PA/BR | 1140 | BGM1702 | AM/BR |
| 1072 | BGM1616 | BA/BR | 1095 | BGM1643 | PA/BR | 1118 | BGM1677 | PA/BR | 1141 | BGM1703 | AM/BR |
| 1073 | BGM1617 | NR    | 1096 | BGM1645 | BA/BR | 1119 | BGM1678 | PA/BR | 1142 | BGM1704 | AM/BR |
| 1074 | BGM1618 | NR    | 1097 | BGM1646 | SE/BR | 1120 | BGM1679 | PA/BR | 1143 | BGM1705 | AM/BR |
| 1075 | BGM1619 | NR    | 1098 | BGM1648 | BA/BR | 1121 | BGM1680 | PA/BR | 1144 | BGM1706 | AM/BR |
| 1076 | BGM1620 | PB/BR | 1099 | BGM1649 | BA/BR | 1122 | BGM1681 | BA/BR | 1145 | BGM1707 | AM/BR |
| 1077 | BGM1621 | PB/BR | 1100 | BGM1650 | BA/BR | 1123 | BGM1682 | BA/BR | 1146 | BGM1708 | AM/BR |
| 1078 | BGM1622 | PB/BR | 1101 | BGM1655 | NR    | 1124 | BGM1683 | BA/BR | 1147 | BGM1709 | AM/BR |
| 1079 | BGM1623 | PB/BR | 1102 | BGM1656 | BA/BR | 1125 | BGM1684 | BA/BR | 1148 | BGM1710 | AM/BR |
| 1080 | BGM1624 | PB/BR | 1103 | BGM1657 | BA/BR | 1126 | BGM1685 | BA/BR | 1149 | BGM1711 | AM/BR |
| 1081 | BGM1626 | PB/BR | 1104 | BGM1658 | BA/BR | 1127 | BGM1688 | BA/BR | 1150 | BGM1712 | AM/BR |
| 1082 | BGM1627 | PE/BR | 1105 | BGM1659 | BA/BR | 1128 | BGM1689 | BA/BR | 1151 | BGM1713 | AM/BR |
| 1083 | BGM1628 | PE/BR | 1106 | BGM1660 | BA/BR | 1129 | BGM1690 | PE/BR | 1152 | BGM1714 | AM/BR |
| 1084 | BGM1629 | CE/BR | 1107 | BGM1661 | SP/BR | 1130 | BGM1691 | BA/BR | 1153 | BGM1715 | AM/BR |
| 1085 | BGM1630 | NR    | 1108 | BGM1662 | SP/BR | 1131 | BGM1692 | BA/BR | 1154 | BGM1716 | AM/BR |
| 1086 | BGM1631 | BA/BR | 1109 | BGM1666 | PA/BR | 1132 | BGM1693 | BA/BR | 1155 | BGM1718 | AM/BR |
| 1087 | BGM1633 | CE/BR | 1110 | BGM1667 | PA/BR | 1133 | BGM1694 | BA/BR | 1156 | BGM1721 | MA/BR |
| 1088 | BGM1634 | CE/BR | 1111 | BGM1668 | PA/BR | 1134 | BGM1696 | PE/BR | 1157 | BGM1722 | MA/BR |
| 1089 | BGM1635 | CE/BR | 1112 | BGM1669 | PA/BR | 1135 | BGM1697 | SP/BR | 1158 | BGM1723 | BA/BR |
| 1090 | BGM1636 | CE/BR | 1113 | BGM1670 | PA/BR | 1136 | BGM1698 | MS/BR | 1159 | BGM1724 | BA/BR |
| 1091 | BGM1637 | PA/BR | 1114 | BGM1671 | PA/BR | 1137 | BGM1699 | MS/BR | 1160 | BGM1725 | BA/BR |

## Suplemento 1: continuação...

| N.º  | Acessos | Local | N.º  | Acessos | Local | N.º  | Acessos | Local    | N.º  | Acessos | Local |
|------|---------|-------|------|---------|-------|------|---------|----------|------|---------|-------|
| 1161 | BGM1727 | BA/BR | 1184 | BGM1751 | MA/BR | 1207 | BGM1779 | MA/BR    | 1230 | BGM1850 | PA/BR |
| 1162 | BGM1728 | BA/BR | 1185 | BGM1752 | MA/BR | 1208 | BGM1780 | MA/BR    | 1231 | BGM1858 | PA/BR |
| 1163 | BGM1729 | MA/BR | 1186 | BGM1753 | MA/BR | 1209 | BGM1782 | MA/BR    | 1232 | BGM1866 | PR/BR |
| 1164 | BGM1731 | MA/BR | 1187 | BGM1754 | MA/BR | 1210 | BGM1783 | MA/BR    | 1233 | BGM1867 | PR/BR |
| 1165 | BGM1732 | MA/BR | 1188 | BGM1755 | MA/BR | 1211 | BGM1784 | MA/BR    | 1234 | BGM1876 | TO/BR |
| 1166 | BGM1733 | MA/BR | 1189 | BGM1756 | MA/BR | 1212 | BGM1794 | MA/BR    | 1235 | BGM1878 | MA/BR |
| 1167 | BGM1734 | MA/BR | 1190 | BGM1757 | MA/BR | 1213 | BGM1810 | BA/BR    | 1236 | BGM1880 | MA/BR |
| 1168 | BGM1735 | MA/BR | 1191 | BGM1759 | MA/BR | 1214 | BGM1814 | BA/BR    | 1237 | BGM1881 | MA/BR |
| 1169 | BGM1736 | MA/BR | 1192 | BGM1760 | MA/BR | 1215 | BGM1816 | RR/BR    | 1238 | BGM1884 | AM/BR |
| 1170 | BGM1737 | MA/BR | 1193 | BGM1761 | MA/BR | 1216 | BGM1817 | NR       | 1239 | BGM1942 | PA/BR |
| 1171 | BGM1738 | MA/BR | 1194 | BGM1763 | MA/BR | 1217 | BGM1818 | BA/BR    | 1240 | BGM1957 | AM/BR |
| 1172 | BGM1739 | MA/BR | 1195 | BGM1764 | MA/BR | 1218 | BGM1819 | MA/BR    | 1241 | BGM1962 | AM/BR |
| 1173 | BGM1740 | MA/BR | 1196 | BGM1765 | MA/BR | 1219 | BGM1821 | BA/PE/BR | 1242 | BGM1969 | NR    |
| 1174 | BGM1741 | MA/BR | 1197 | BGM1766 | MA/BR | 1220 | BGM1824 | PA/BR    | 1243 | BGM1980 | AM/BR |
| 1175 | BGM1742 | MA/BR | 1198 | BGM1767 | MA/BR | 1221 | BGM1828 | PA/BR    | 1244 | BGM1981 | AM/BR |
| 1176 | BGM1743 | MA/BR | 1199 | BGM1768 | MA/BR | 1222 | BGM1830 | PA/BR    | 1245 | BGM1985 | AM/BR |
| 1177 | BGM1744 | MA/BR | 1200 | BGM1769 | MA/BR | 1223 | BGM1832 | PA/BR    | 1246 | BGM1999 | AM/BR |
| 1178 | BGM1745 | MA/BR | 1201 | BGM1770 | MA/BR | 1224 | BGM1834 | PA/BR    | 1247 | BGM2017 | BA/BR |
| 1179 | BGM1746 | MA/BR | 1202 | BGM1771 | MA/BR | 1225 | BGM1835 | PA/BR    | 1248 | BGM2018 | BA/BR |
| 1180 | BGM1747 | MA/BR | 1203 | BGM1772 | MA/BR | 1226 | BGM1837 | PA/BR    | 1249 | BGM2019 | PR/BR |
| 1181 | BGM1748 | MA/BR | 1204 | BGM1773 | MA/BR | 1227 | BGM1840 | PA/BR    | 1250 | BGM2022 | PR/BR |
| 1182 | BGM1749 | MA/BR | 1205 | BGM1776 | NR    | 1228 | BGM1842 | PA/BR    | 1251 | BGM2025 | NR    |
| 1183 | BGM1750 | MA/BR | 1206 | BGM1777 | MA/BR | 1229 | BGM1847 | PA/BR    | 1252 | BGM2028 | NR    |

**Suplemento 1:** continuação...

| N.º  | Acessos     | Local  | N.º  | Acessos            | Local  | N.º  | Acessos   | Local  | N.º  | Acessos  | Local  |
|------|-------------|--------|------|--------------------|--------|------|-----------|--------|------|----------|--------|
| 1253 | BGM2029     | NR     | 1259 | BRS Guaira         | Brasil | 1265 | Ecu 72    | Brasil | 1271 | 9607-07  | Brasil |
| 1254 | BGM2030     | NR     | 1260 | BRS Kiriris        | Brasil | 1266 | Irará     | Brasil | 1272 | 9624-09  | Brasil |
| 1255 | BGM2032     | NR     | 1261 | BRS Mani<br>branca | Brasil | 1267 | Lagoa     | Brasil | 1273 | 9655-02  | Brasil |
| 1256 | BGM2034     | NR     | 1262 | BRS Mullatinha     | Brasil | 1268 | Sergipe   | Brasil | 1274 | 98150-06 | Brasil |
| 1257 | Brasil      | Brasil | 1263 | BRS Verdinha       | Brasil | 1269 | Baianinha | Brasil |      |          |        |
| 1258 | BRS Formosa | Brasil | 1264 | Cidade Rica        | Brasil | 1270 | 9602-02   | Brasil |      |          |        |

**Fonte:** Dados de Passaporte do Banco de Germoplasma Mandioca (Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Brasil).

Legenda: NR - Indivíduos Não Referenciados; BR – Brasil; Siglas referentes aos estados brasileiros: AC – Acre; AL – Alagoas; AM – Amazonas; BA – Bahia; CE – Ceará; ES – Espírito Santo; MA – Maranhão; MG – Minas Gerais; MT – Mato Grosso; PA – Pará; PE – Pernambuco; PI – Piauí; PR – Paraná; RJ – Rio de Janeiro; RN – Rio Grande do Norte; RO – Roráima; RR – Rondônia; RS – Rio Grande do Sul; SC – Santa Catarina; SE – Sergipe; SP – São Paulo; TO – Tocantins.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de marcadores gene-alvo pela técnica TRAP baseados em sequências expressas (Capítulo 1) e a identificação via seleção assistida de genótipos com alelos relacionados à resistência ao mosaico africano (Capítulo 2) representam avanços na caracterização molecular e no pré-melhoramento da cultura. A mandioca é um importante recurso genético brasileiro, que demanda uma melhor caracterização para identificação de alelos de interesse para uso no melhoramento da cultura e para fins de sua conservação. Neste sentido, a caracterização molecular otimiza as atividades de melhoramento, sobretudo quando se utilizam marcadores funcionais ou com polimorfismo baseado em regiões gênicas e ainda permite a identificação de duplicatas e a caracterização da variabilidade em bancos de germoplasma.

A praticidade no desenvolvimento dos iniciadores, os níveis de polimorfismo observados, associados à especificidade da região amplificada, tornam a técnica TRAP uma poderosa ferramenta para análises moleculares em mandioca. Ademais, o polimorfismo dos marcadores TRAP foi bastante elevado com fácil implementação e com baixo custo em comparação a outros tipos de marcadores. As 69 melhores combinações TRAP permitiram a identificação de 606 alelos com variação de 3 a 18, com média de 8,8 alelos por combinação. Os iniciadores mais polimórficos (>70% de fragmentos polimórficos, PIC >0,25 e Rp >3,21) estão relacionados à biossíntese de amido, carotenoides, compostos cianogênicos, deterioração fisiológica pós-colheita, formação de raízes tuberosas e respostas de defesa. Porém, pesquisas complementares devem ser conduzidas com o objetivo de associar as rotas metabólicas analisadas ao fenótipo e validar marcas funcionais.

Em relação à resistência ao vírus do mosaico africano (CMD) a seleção assistida por marcadores (SAM) permitiu a seleção de sete acessos contendo o gene *CMD2*. Contudo, considerando que genótipos que exibem marcas ligadas ao *CMD2* apresentam uma variação no nível de resistência (de moderada a alta), os trabalhos de validação das fontes de resistência em regiões com alta incidência possibilitarão a confirmação da natureza da resistência nos genótipos selecionados. Evidentemente o desenvolvimento de novas variedades de mandioca não deve ser realizado apenas objetivando a



introdução do gene que confere resistência ao CMD sendo, portanto necessária a introgressão de demais genes relacionados a características de interesse agrônomo. Assim a seleção preventiva de genótipos via SAM implementada neste trabalho deve reduzir gerações na transferência de alelos sendo a forma mais eficaz para o desenvolvimento de novas variedades com características desejáveis para a indústria e para o consumo *in natura* adicionada a resistência ao mosaico africano. Desta forma, o cruzamento entre as fontes de resistência encontradas neste trabalho e variedades elites de mandioca brasileiras, permitirá sua utilização em países afetados pelo mosaico africano, abrindo novas oportunidades comerciais para as variedades lançadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. Ademais, a presença do inseto vetor no Brasil justifica a seleção preventiva de genótipos resistentes, caso as proibições quarentenárias não impeçam a chegada da virose ao país.

Apesar de preferíveis para as atividades de melhoramento genético, marcadores gene-alvo e funcionais têm seu uso e desenvolvimento limitado na cultura da mandioca. Os resultados obtidos, portanto, disponibilizam uma nova ferramenta molecular associada a genes candidatos relacionado a rotas metabólicas importantes, bem como proporciona avanços na utilização da seleção assistida na cultura uma vez que permite a identificação e seleção de genótipos potencialmente resistentes ao mosaico africano.