

**CITOGENÉTICA COMO FERRAMENTA PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL:
ANÁLISE MITÓTICA E MEIÓTICA EM ESPÉCIES DE *Manihot****

Reginaldo de CARVALHO¹, Kaliny Veiga Pessoa da SILVA², Iêda Ferreira de OLIVEIRA³,
Alfredo Augusto Cunha ALVES⁴

RESUMO: No presente trabalho, acessos de *Manihot* foram analisados quanto ao número, morfologia e tamanho cromossômico, além do número e da posição das constrições secundárias, comportamento meiótico e localização dos sítios de DNAr 5S e 45S. Em todos os acessos observados o número cromossômico foi semelhante, apresentando $2n=36$ cromossomos de metacêntricos a submetacêntricos. Dois pares de constrições secundárias terminais foram observados em cada um dos acessos, exceto na espécie *M. leptophylla* que apresentou dois pares de constrição secundária proximais. A meiose mostrou-se regular nas espécies silvestres e bastante irregular nos acessos de *M. esculenta*. A hibridização *in situ* - FISH revelou seis sítios de DNAr 45S e apenas um par de cromossomos com sítios de DNAr 5S. Esses dados sugerem uma grande similaridade no complemento cromossômico entre as espécies de *Manihot*. Por outro lado, eles revelam a importância da análise cromossômica e da meiose em acessos de bancos de germoplasma como ferramenta nos programas de melhoramento de mandioca.

Palavras- chave: FISH, constrições secundárias, cromossomos meióticos.

SUMMARY: CYTOGENETICS AS A TOOL FOR PLANT GENETIC BREEDING: ANALYSIS OF MITOSIS AND MEIOSIS IN *Manihot* SPECIES. Accessions of *Manihot* species were analyzed in this work for number, morphology and size of chromosomes. The number of secondary constrictions, meiotic behavior and the location of 5S and 45S rDNA sites were also observed. All investigated accessions showed a similar karyotype with $2n=36$, small metacentric to submetacentric chromosomes. Two pairs of terminal secondary constrictions were observed in each accession except *M. leptophylla*, which presented two proximal secondary constrictions. The meiosis investigated was regular in the wild species, displaying 18 bivalents, but with irregularity in the accessions of *M. esculenta*. The analysis with fluorochromes frequently showed six 45S rDNA sites revealed by FISH and only one chromosome pair presented a 5S rDNA site. These data suggest that all *Manihot* species present a very similar chromosome complement. On the other hand, the results show us the importance of the chromosome analysis and the investigation on the meiosis cycle in *Manihot* species as a tool in cassava breeding programs.

Keywords: FISH, secondary constrictions, chromosomes meiotic.

* Trabalho financiado pelo Generation Challenge Programme (GCP) e Embrapa

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Depto. de Biologia. Rua Dom Manuel de Medeiros s/n - Dois irmãos - CEP: 52171-900 – Recife- PE. Email: Reginaldo.ufrpe@gmail.com

² Universidade Federal Rural de Pernambuco. Mestranda em Melhoramento Genético de Plantas, Depto. de Biologia. Email: kalinyveiga@hotmail.com

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Depto. de Biologia. Email: iedaferreira@yahoo.com.br

⁴ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Caixa Postal 007, CEP: 44380-000, Cruz das Almas, BA. Email: aalves@cnpmf.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A maior diversidade biológica das espécies do gênero *Manihot* no Brasil ocorre na Região Central, nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Muitas das espécies também ocorrem na Região Nordeste e na Região Amazônica (Rogers e Appan, 1973; Nassar, 2000; Allem, 2002). Nos últimos anos, a destruição dos habitats naturais tem levado de forma alarmante a perda da diversidade genética da mandioca e das espécies aparentadas. Com isso, muitas espécies de *Manihot*, encontram-se ameaçadas de extinção. Nassar (2006) relatou o desaparecimento de 40 populações naturais de um total de 41 localizadas em diversas regiões do Brasil entre os anos de 1977 e 2001, confirmando a grave situação em que se encontram as populações nativas das espécies de *Manihot*, sugerindo um esforço conjunto por parte dos grupos de pesquisas para o desenvolvimento de programas de preservação *in situ* em bancos de germoplasmas das espécies silvestres detentoras da ampla diversidade genética e características agronômicas úteis.

A caracterização genética de diferentes acessos de bancos de germoplasmas constitui-se em importante fonte de dados para melhoristas e conservacionistas, uma vez que permite um melhor gerenciamento do “pool” gênico, bem como uma seleção mais eficiente dos recursos genéticos, facilitando a detecção da variabilidade genética para fins de melhoramento genético ou com fins biotecnológicos (Benko-Iseppon, 2001). O estudo citogenético em espécies de importância econômica pode contribuir de forma significativa nas etapas que antecedem os cruzamentos de linhagens parentais nos programas de melhoramento genético. A análise cariotípica em células meióticas ou mitóticas possibilita a identificação dos polimorfismos cromossômicos numéricos ou estruturais entre os cariótipos e a descrição da homologia cariotípica em cultivares ou espécies fornecendo, informações relevantes como alterações cromossômicas, taxa de fertilidade, problemas no reconhecimento dos homólogos, não disjunção cromossômica nas anáfases, gerando gametas aneuplóides, percentual dos genomas parentais nos híbridos, etc. Esses dados podem ser inclusos nos esquemas de cruzamentos contribuindo na pré-seleção de linhagens progenitoras ou ainda, determinando o percentual de genomas parentais nos indivíduos híbridos. Desta forma, a indicação de parentais favoráveis a hibridações pode ser auxiliada pelo uso de parâmetros citogenéticos.

As espécies de *Manihot* são consideradas alotetraplóides com $2n=36$ e um número básico $x=9$. Contudo, acredita-se que essas espécies tenham sido diploidizadas ao longo do processo evolutivo apresentando hoje, o comportamento típico de um diplóide. Além disso, cruzamentos interespecíficos podem ocorrer freqüentemente produzindo híbridos naturais e, que, nos casos de esterilidade, essa característica pode não ser facilmente detectada por análise fenotípica comprometendo etapas importantes no melhoramento genético. Apresentamos aqui algumas características cariotípicas observadas em cromossomos mitóticos e meióticos de espécies de *Manihot* objetivando estabelecer relações entre dados citogenéticos e sua utilização em Programas de Melhoramento Genético (Carvalho e Guerra 2002; Nassar, 2000; Rogers e Appan, 1973).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas as espécies *Manihot esculenta* (‘manipeba’, ‘aipim bravo’ e ‘pornunça-bebedouro’), *M. glaziovii*, *M. dichotoma* e *M. leptophylla*.

Pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína na concentração de 0,002M por 24 horas a ~10°C. Em seguida as raízes foram postas em solução fixadora de etanol-ácido acético (3:1, v/v) por 24 h a temperatura ambiente e acondicionada em freezer a -20°C. Os botões florais foram colocados diretamente em solução fixadora e estocados a -20°C antes da preparação das lâminas. Para análise citogenética convencional seguiu-se a metodologia de Guerra (1983). As raízes foram lavadas duas vezes em água destilada, hidrolisadas em HCl 5N por 20 minutos e as lâminas foram coradas com Giemsa 2%. No caso dos botões florais, esses foram hidrolisados por apenas 5 minutos.

A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada de acordo com o protocolo de Morais et al. (2007). As sondas de DNAr 45S foram marcadas com biotina e detectada com anticorpo anti-biotina conjugado com TRITC. A sonda de DNAr 5S foi marcada com digoxigenina e detectada com anti-digoxigenina conjugado com FITC. As lâminas contendo as preparações citológicas foram lavadas em fixador Carnoy e submetidas a uma série alcoólica. Em seguida foram desnaturadas a 75°C em solução salina de 2xSSC por 7 min, a desnaturação da sonda ocorreu também a 75°C durante 10 min. A solução contendo a sonda foi adicionadas às lâminas e essas, transferidas para uma câmara úmida a 37°C por 16 horas. Após os passos de hibridização, detecção e lavagens, as lâminas foram montadas com DAPI (2 µg/mL) em meio de montagem apropriado para hibridização *in situ*.

As imagens foram capturadas com câmera digital Cyber shot Sony 5.1 MP e transferidas para o programa computacional Corel Draw V.12 para processamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Manihot* parece apresentar uma forte homogeneidade entre suas espécies ao nível cariotípico, ao contrário da ampla plasticidade botânica observada entre suas espécies. Todas as espécies analisadas no presente trabalho apresentaram cariótipos semelhantes com $2n=36$, morfologia cromossômica de meta a submetacêntrica, tamanho médio cromossômico de 1,75µm e número máximo de dois pares satelitados com constrições secundárias (RON) subterminais (Figura 1). Os sítios ribossômicos foram em número de seis para o DNAr 45S e dois para o DNAr 5S e sempre na mesma posição (Figuras 3 e 4) não representando uma boa marca citogenética para distinção das espécies. Esses dados estão de acordo com dados previamente registrados na literatura (Carvalho e Guerra, 2002; Nassar et al., 1995; Umanah e Hartmann, 1973). Apenas a espécie *M. leptophylla* apresentou diferença em seu cariótipo apresentando as constrições secundárias próximas ao centrômero e não subterminal como nas outras espécies, sempre sendo observado um número máximo de quatro RONs (Figura 2). Este polimorfismo das RONs foi considerado como um marcador espécie-específico.

As espécies de *Manihot* são consideradas alotetraplóides. Para explicar o sucesso que algumas espécies consideradas poliplóides possuem, tem se discutido a diploidização do cariótipo como processo adaptativo ao longo do processo evolutivo (Singh, 1993). Esse mecanismo pode ter ocorrido dentro do gênero *Manihot* levando a estabilidade cariotípica observada entre suas espécies. As hibridações interespecíficas, com produção de híbridos férteis podem ocorrer, naturalmente ou artificialmente, com quebra de barreiras de isolamento reprodutivo. Por outro lado, todas as espécies, principalmente a mandioca apresentam a via assexuada (estacas ou manivas) como processo

alternativo de reprodução, contornando possíveis problemas meióticos pré ou pós-zigóticos (Nassar, 2000; Carvalho e Guerra, 2002).

A meiose nas espécies silvestres foi normal observando-se 18 bivalentes na metáfase I e uma segregação regular dos cromossomos homólogos nas anáfases I e II. No final da esporogênese formaram-se, em todas as espécies silvestres, quatro micrósporos, revelando uma meiose completamente regular em termos de divisão celular. A variedade 'manipeba' apresentou um comportamento meiótico muito irregular com a ocorrência de univalentes, bivalentes e trivalentes revelando comportamento típico de um indivíduo triploide. A segregação cromossômica no final da meiose (anáfase II) foi também irregular, resultando em 100% das tétrades ou "políades" anormais apresentando um grande número de núcleos no seu interior (Figuras 5 e 6). Para este acesso, a coloração carmim acético mostrou grãos de pólen de diversos tamanhos e sem conteúdo citoplasmático, sugerindo esterilidade total. No acesso 'pornunça-bebedouro' foram observadas políades com número inferior de micronúcleos e univalentes em relação a cultivar manipeba, sugerindo um nível mais atenuado ou parcial de irregularidade meiótica parcial (Figuras 7 e 9). Seguida a essa análise, será realizada uma quantificação dessas irregularidades e teste de viabilidade dos esporos entre os materiais analisados. A ocorrência de eventos de poliploidização espontânea parece não ser um evento freqüente no gênero e a ocorrência de irregularidades meióticas, embora descritos por muitos autores em espécies de *Manihot* não tem sido tratados utilizando parâmetros estatísticos (De Carvalho et al. 1999; Hahn et al. 1990; Nassar et al. 1995).

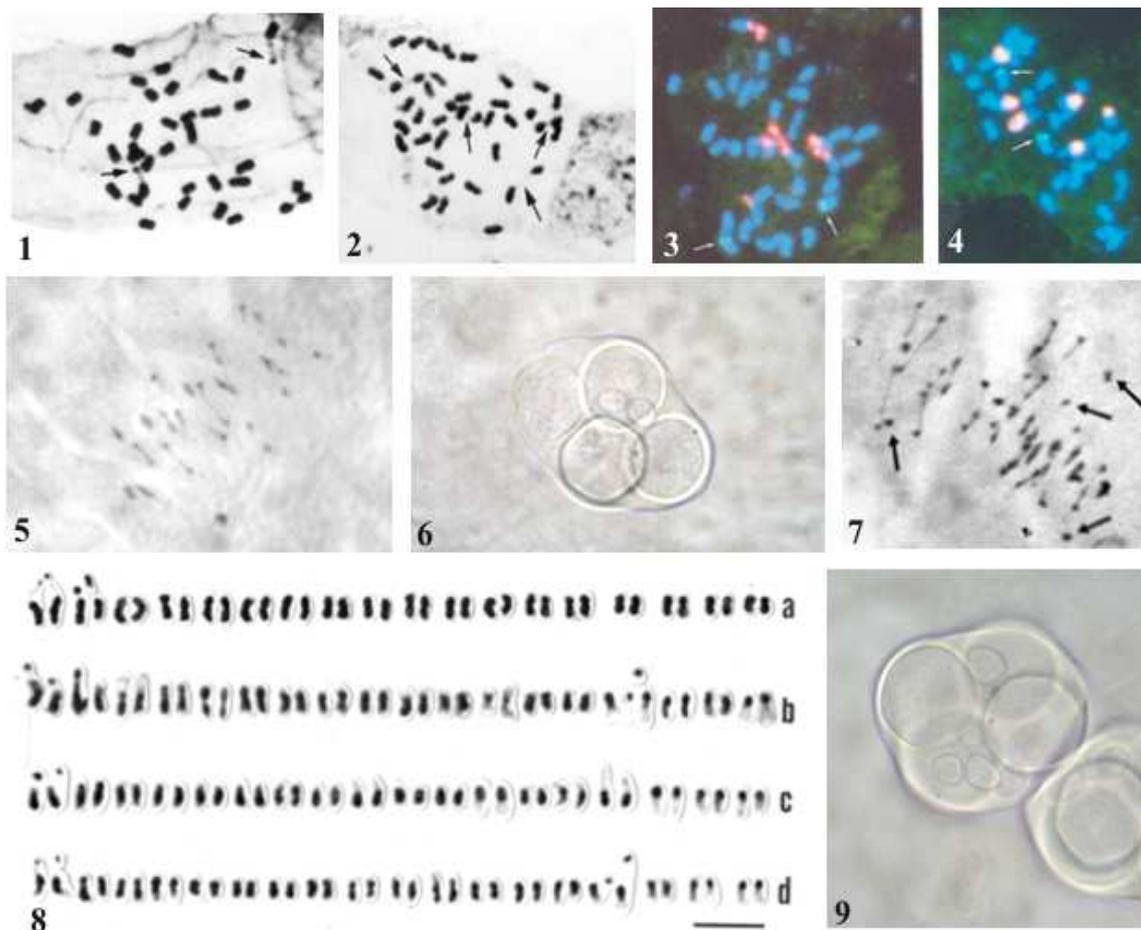
CONCLUSÃO

Esses dados refletem claramente, a possibilidade de uso dos parâmetros citogenéticos e a importância de uma avaliação prévia dos cromossomos nos acessos incluídos nos esquemas de cruzamentos em programas de melhoramento genético. Na análise dos cromossomos metafásicos mitóticos observou-se uma diferença marcante no número e posição das regiões organizadoras dos nucléolos (RONs) entre *M. leptophylla* e *M. glaziovii* sendo este considerado um bom marcador espécie-específico. Por outro lado, a análise meiótica se mostrou mais eficiente na identificação de características que podem ser utilizadas de forma prática e direta na seleção das linhagens parentais, considerando as diversas irregularidades durante a divisão meiótica e que poderá influenciar na obtenção de híbridos com diversos níveis de fertilidade. É possível que o emprego de um maior número de técnicas de bandeamento utilizando DNA satélite, hibridização com BACs ou mesmo da hibridização genômica *in situ* em cromossomos mitóticos, possa ampliar o nível de polimorfismo e conseqüentemente o número de marcadores espécie-específicos, complementando a análise meiótica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEM, A. C. The origin and taxonomy of cassava, In: HILLOCKS, R.J.; THRESH, J.M.; BELLOTTI, A. C. (Eds.). **Cassava: Biology, Production and Utilization**. Oxon, UK: CABI Publishing, p.1-16, 2002.
- BENKO-ISEPPON AM (2001) Estudos moleculares e citogenéticos no Caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. EMBRAPA Documentos 56: 327-332

- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas** 136: 159-168. 2002.
- DE CARVALHO, R.; GUERRA, M.; CARVALHO, P. C. L. Occurrence of Spontaneous Triploidy in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia: The Japan Mendel Society**, v. 64, p. 137-140, 1999.
- GUERRA, M.. Uso do giemsa na citogenética vegetal: comparação entre bandeamento simples e o bandeamento. **Ci e Cult.** 35: 190-193. 1983.
- HAHN, S, K., BAÍ, V, K. e ASIEDU, R. Tetraploids, triploids and 2n pollen from diploid int sava.Theor. Appl. **Genetic**: v 79. 433-439. 1990.
- MORAIS, A, P., SOARES FILHO. W.S., GUERRA, M. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. **chromosome research.** 15:115-121. 2007.
- NASSAR, N.M.A. Wild cassava spp.: biology and potentialities for genetic improvement. **Genet. Mol. Biol.** 23: 201-212, 2000.
- NASSAR, N. M. Cassava genetic resources: extinct everywhere in Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution.** 53: 975–983. 2006.
- NASSAR, N.M.A, NASSAR H.N.M, VIEIRA, C e SARAIVA, S.L. (1995) Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and its backcross progeny. **Can. J. Plant Sci.** 75: 675–678.
- ROGERS, D.J. e APPAN, S.G. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae). **Flora Neotropica.** New York: Hafner Press (monografia, 13). 1973.
- SINGH, R, J. plant cytogenetics.. 1993, CRC Press, Inc. Boca Raton: 111-254.
- UMANAH, E. E.; HARTMANN, R. W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species. **Journal of American Society of Horticulture Science**, v. 98, p. 272-274, 1973.



Figuras 1 a 9 - Células mitóticas e meióticas de espécies de *Manihot*. 1) metáfase mitótica de *M. glaziovii* (setas mostram um par de constrições secundárias terminais -“RONS”); 2) metáfase mitótica de *M. leptophylla* (setas apontam dois pares de RONS proximais). 3-4) metáfases mitóticas de *M. dichotoma* e *M. esculenta* ‘Aipim bravo’ revelando os sítios de DNAr 45S (cores vermelho e rosa) e de DNAr 5S (cor verde) setas pequenas. 5-6) metáfase-anáfase I e políade mostrando dois micronúcleos em *M. esculenta* ‘pornunça bebedouro’. 7 e 9) metáfase-anáfase I e políade com cinco micronúcleos no interior do meiócito em *M. esculenta* ‘manipeba’ (setas apontam para cromossomos univalentes). 8) cariograma de quatro metáfases mitóticas de espécies de *M. esculenta* coradas convencionalmente (barra corresponde a 20 μ m).