

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

DAVID OLIVEIRA DA SILVA

Estudos citogenéticos de espécies dos gêneros *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae Juss.),
Bambusa e *Dendrocalamus* (Poaceae Barnhart)

Recife
2016

DAVID OLIVEIRA DA SILVA

**Estudos citogenéticos de espécies dos gêneros *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae Juss.),
Bambusa e *Dendrocalamus* (Poaceae Barnhart)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte do requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Comitê de orientação:

Professor Dr. Reginaldo de Carvalho - Orientador ó UFRPE ó Recife ó PE

Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves ó EMBRAPA ó Cruz das Almas - BA

**Recife
2016**

**Estudos citogenéticos de espécies dos gêneros *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae
Juss.),
Bambusa e *Dendrocalamus* (Poaceae Barnhart)**

DAVID OLIVEIRA DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: /____/_____

ORIENTADOR:

Dr. Reginaldo de Carvalho

EXAMINADORES:

Dr.^a Margareth Ferreira Sales

Dr.^a Maria Betânia Melo de Oliveira

SUPLENTE:

Dr.^a Ana Christina Brasileiro Vidal

Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza

**Recife ó PE, Brasil
Fevereiro, 2016**

Ficha catalográfica

S586e Silva, David Oliveira da
Estudos citogenéticos de espécies dos gêneros *Manihot* Mill.
(Euphorbiaceae Juss.), *Bambusa* e *Dendrocalamus* (Poaceae Barnhart)
/ David Oliveira da Silva. ó Recife, 2016.
86 f.: il.

Orientador: Reginaldo de Carvalho.
Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) ó
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Agronomia, Recife, 2016.
Inclui referências e apêndice(s)..

1. Citogenética 2. Mandioca 3. Bambu 4. Tipos cromossômicos
5. Hexaploide I. Carvalho, Reginaldo de, orientador II. Título

CDD 581.15

Aos meus pais e meus irmãos, minha sobrinha, meus cunhados e cunhadas que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e desafios. À minha companheira Amanda, que sempre foi minha inspiração para seguir em frente. Aos meus amigos que sempre me auxiliaram quando deles precisei,

DEDICO

O tempo é inquebrável.
Um único segundo pode
mudar tudo.

David Oliveira

AGRADECIMENTOS

À Glória Do Supremo Arquiteto Do Universo.

Ao meu pai Valdemir e a minha mãe Magali, meus baluartes, minhas colunas de suporte, meus exemplos a seguir hoje sempre. Obrigado por todo o apoio, carinho, amor e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos Dennys e Darlan e minha irmã Danielle que apesar de quaisquer desavenças, sempre estiveram e estão junto a mim.

À minha amada companheira Amanda, minha fonte de amor, carinho e inspiração para lutar e seguir em frente todos os dias de nossas vidas.

À minha sobrinha Eloise que é simplesmente uma das coisas mais lindas que existe.

Aos meus cunhados e cunhadas, aos meus sogros Odete e Daniel pelo apoio também estendido a mim, sempre que precisei.

Aos meus Iir.: das Ordens Maçônica e DeMolay, pelos ensinamentos, orientações, apoio e afeto fraternal que sempre tiveram para comigo.

Ao meu Orientador Reginaldo de Carvalho que mesmo através das dificuldades, me ajudou a driblar os problemas e conquistar novos caminhos, meu obrigado.

Ao meu Coorientador Alfredo Alves pelo auxílio na execução deste trabalho.

À EMBRAPA Mandioca e Fruticultura pelos acessos cedidos do banco de germoplasma de mandioca para execução de parte deste trabalho.

À empresa Agrimex S.A. pelos acessos cedidos do banco de germoplasma de bambu para execução de parte deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de apartamento Hugo, Dário e Rodolfo por todos os momentos de alegrias, estresses, frustrações, risadas, aconselhamentos e tudo o mais.

Aos meus colegas de laboratório Genialdo, Angélica, Viviane, Lamonier, Vanessa, Horace, Silmar, Rayanne, Ravanny, Mirela e Karla sempre me auxiliaram quando precisei. De seus aconselhamentos, sugestões, críticas, brincadeiras.

Aos colegas de outros laboratórios: Janaina Teixeira, Sirando, Aryana, Herla, Rhuan, Robson, Paulo, Fábio e muitos outros que peço perdão por não os nomear todos. Pois, muito contribuíram nas minhas atividades ao longo do mestrado.

Aos meus Professores e Professoras por todo o conhecimento, aprendizado e aconselhamento dedicados ao longo do curso.

Em especial às Professoras Dra. Ana Christina, Dra. Ana Benko, Dra. Andrea Pedrosa, Dra. Magdalena Vaio e aos Professores Dr. Leonardo Felix, Dr. Mark Chase, Dr. George Staples, Dr. Andreas Rouben e Dr. Joerg Fuchs, pelos conhecimentos, ensinamentos e oportunidades ofertadas as quais pude usufruir.

Às coordenações e seus secretariados dos cursos de Pós-graduação em Agronomia e em Botânica, pelos espaços para execução de minhas atividades, bem como na disponibilidade para me auxiliar quando precisei.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo acesso e disponibilidade de suas dependências, principalmente à Biblioteca Central e o Restaurante Universitário.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a execução das atividades do curso e que para não lhes fazer injustiça por esquecimento de alguém, não os nomearei.

Muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Complementos cromossômicos registrados *via* coloração convencional por Giemsa de cultivares de *Manihot esculenta* e espécies relacionadas. (a) *M. esculenta* BGM 0867; (b) *M. esculenta* BGM 342; (c) *M. glaziovii*; (d) *M. dichotoma*; (e) *M. peruviana*; (f) *M. anômala*; (g) *M. tomentosa*; (h) *M. esculenta* BGM 0537; (i) *M. irwinii*; (j) *M. esculenta* cv Isabel de Souza; (k) *M. esculenta* BGM 0549 (célula incompleta); (l) *M. esculenta* BGM 1159; (m) *M. esculenta* BGM 66; (n) *M. esculenta* BGM 1444; (o) *M. esculenta* Clone 83194; (p) *M. esculenta* cv. Cruvela; (q) *M. esculenta* cv. Jaburu; (r) *M. esculenta* cv. Macaxeira-peixe. Setas indicam satélites. Barras indicam 10 µm. 50

Figura 2. . *esculenta* BGM 1159; (b) *M. esculenta* cv. Cruvela; (c) *M. esculenta* cv. Mandiocaba; (d) *M. maracasensis*; (e) *M. elongata*; (f) *M. leptophylla*; (g) *M. glaziovii*; (h) *M. glaziovi* subsp *noronhense*; (i) *M. dichotoma*; (j) Híbrido de *M. reflexifolia*; (k) *M. reflexifolia* (possível parental). *Quando hibridizado consecutivamente e/ou conjuntamente; **Sítio extra em heterozigose; ***Ocorrência variável; (↔) dois sítios 45S terminais. Letras em maiúsculo representam os tipos cromossômicos do gênero. **Ver figura 3.** Escala representa valores médios dos cromossomos.. 51

Figura 3. Nomenclatura de tipos cromossômicos encontrados em espécies do gênero *Manihot* com base no tamanho, número e posição dos sinais de bandeamento CMA/DAPI e hibridização in situ de sondas de DNAr 45S e 5S. Tipos: **A**= Banda CMA⁺ longa; **B**= Banda CMA⁺ longa + Satélite; **C**= Banda CMA⁺ terminal; **D**= Banda CMA⁺ terminal + Satélite; **E**= Banda CMA⁺ terminal em ambos os braços cromossômicos; **F**= DNAr 45S terminal; **G**= DNAr 45S subterminal; **H**= DNAr 45S pericentroméricas; **I**= Sobreposição dos tipos C e F; **J**= DNAr 5S subterminal; **K**= DNAr 5S pericentromérico; **L**= Sem marcações. 52

CAPÍTULO III

Figura 1. Metáfases coradas com Giemsa. (a) *Dendrocalamus asper*, 2n = 70; (b) *Bambusa vulgaris* var. *vittata*; (c) *D. giganteus*, 2n = 64±1; (d) *B. tuldoides*, 2n = 68; (e) *B. vulgaris* var. *vulgaris*, 2n = 58; (f) *B. textillis*, 2n = 66; núcleos interfásicos dos tipos reticulado (g) e semi-reticulado (h) em *B. vulgaris* var. *vittata*. Barra em (g) corresponde a 10µm. 68

Figura 2. Idiograma de espécies do gênero *Bambusa*. (a) *B. textilis*; (b) *B. vulgaris* var. *vulgaris*; (c) *B. tuldoides*; (d) *B. vulgaris* var. *vittata*. (*) indicam cromossomos que diferiram ±1 cromossomo na análise cariotípica. 69

Figura 3. Idiograma de espécies do gênero *Dendrocalamus*. (a) *D. giganteus*; (b) *D. asper*. (*) indicam cromossomos que diferiram ±1 cromossomo na análise cariotípica. 70

Figura 4. Representação esquemática e cariograma dos cromossomos com bandas CMA⁺ das espécies de *Bambusa*. 70

Figura 5. Representação esquemática e kariograma dos cromossomos com bandas CMA+ das espécies de *Dendrocalamus*. 71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Lista de espécies analisadas, origem e conjunto cromossômico somático. 48

Tabela 2. Número cromossômico (2n); Média do Comprimento Cromossômico (CMC); Cromossomo menor e maior (b-B); Média da razão entre braço longo e curto (R) e do Índice Centromérico (IC); Fórmula Cariotípica Média (M: metacêntrico) de espécies do gênero *Manihot* Mill. Seções descritas de acordo com Rogers e Appan (1973). *Cromossomos menos condensados. 49

CAPÍTULO III

Tabela 1. Relação das espécies estudadas neste trabalho e caracterização morfométrica quanto ao número cromossômico (2n); Média do Comprimento Cromossômico (CMC); Cromossomo menor e maior (B-b); Média da razão entre braço longo e curto (R) e do Índice Centromérico (IC); Fórmula Cariotípica Média (M: metacêntrico) de sete espécies dos gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus*. 67

LISTA DE ABREVIATURAS

(R)	Média da razão entre braço longo e curto
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
2n	Conjunto diploide de uma espécie
8-HQ	8-Hidroxiquiloneína
AT/CG	Adenina/Timina; Citosina/Guanina
b-B	Tamanho relativo do menor e do maior cromossomo observado
CMA	Cromomicina A
CMC	Média do Comprimento Cromossômico
Cy3	Cyanine Dye 3
DAPI	2, 4-6 diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DNAr	Ácido Desoxiribonucleico ribossomal
FISH ó	Fluorochrome <i>in situ</i> Hybridization (Hibridização Fluorocrômica <i>in situ</i>)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
GISH	Genomic <i>in situ</i> Hybridization (Hibridização Genômica <i>in situ</i>)
HCl ó	Ácido clorídrico
HIS	(Hibridização <i>in situ</i>)
IC	Índice Centromérico
M	Metacêntricos (Levan, 1964)
mm	Milímetro
mM	Milimolar
n	Conjunto haploide de uma espécie
nm	Nanômetro
RONs	Regiões organizadoras do nucléolo
Sat(s)	Satélite(s)
SM	Submetacêntricos (Levan, 1964)
x	Número cromossômico básico de um grupo

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I	14
1. Introdução geral.....	15
2. Referencial teórico.....	17
2.1 Melhoramento de plantas e citogenética.....	17
2.2 Gênero <i>Manihot</i> Miller.....	18
2.2.1 Aspectos botânicos.....	18
2.2.2 Importância econômica.....	19
2.2.3 Estudos citogenéticos.....	20
2.3 Subfamília Bambusoideae.....	21
2.3.1 Aspectos botânicos.....	21
2.3.2 Importância econômica.....	22
2.3.3 Estudos citogenéticos.....	22
2.4 Técnicas citogenéticas.....	23
2.4.1 Coloração convencional.....	23
2.4.2 Coloração diferencial por fluorocromos.....	23
2.4.3 Hibridização Fluorescente in situ ó FISH.....	24
3. Referências bibliográficas.....	25
CAPÍTULO II	32
Título.....	33
Resumo.....	33
Title.....	34
Abstract.....	34
Introdução.....	35
Materiais e métodos.....	35
Resultados e discussão.....	37
Conclusões.....	41
Agradecimentos.....	41
Referências bibliográficas.....	42
Tabelas.....	48
Figuras.....	50
CAPÍTULO III	53
Título.....	54
Resumo.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	57
Materiais e métodos.....	58
Resultados.....	59
Discussão.....	61
Agradecimentos.....	66
Apêndices.....	67
Referências bibliográficas.....	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
ANEXOS	76

RESUMO

Estudos citogenéticos de espécies dos gêneros *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae Juss.), *Bambusa* e *Dendrocalamus* (Poaceae Barnhart)

A Citogenética tem se destacado em diversas pesquisas por ser capaz de apresentar dados substanciais quanto à constituição cromossômica de uma espécie. A simples caracterização cromossômica através de técnicas citogenéticas convencionais podem oferecer informações importantes sobre número, morfologia, tamanho cromossômico, tipo de núcleo interfásico e padrão de condensação profásico, informações que auxiliam na compreensão da filogenia e evolução de espécies. Análises citogenéticas de espécies vegetais de interesse agrônomico são de grande valia para a compreensão da evolução destas, bem como na busca de características agrônomicas que possam ser assistidas e/ou controladas pelo manejo em um programa de melhoramento. Estas informações podem subsidiar boas estratégias para programas de melhoramento das culturas da mandioca (Euphorbiaceae) e do bambu (Poaceae). Tais culturas destacam-se pelas suas características alimentares/comerciais e industriais, respectivamente. Com intuito de buscar informações que auxiliem na compreensão evolutiva e constituição e caracterização cariotípica, além da obtenção de dados que subsidiem programas de melhoramento destas culturas, espécies dos gêneros *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae), *Bambusa* e *Dendrocalamus* (Poaceae) foram analisadas citogeneticamente por meio de técnicas convencionais de coloração e por fluorocromos (FISH). $2n = 36$ cromossomos foram observados em todas as espécies de *Manihot* com morfologia variando de metacêntricos a submetacêntricos, com variação no número e posição de sinais de bandeamento via coloração por fluorocromos CMA/DAPI e sinais de DNAr 45S e 5S, provendo um índice de tipologia cromossômica para caracterização de espécies do gênero podendo ser estes dados aplicados aos estudos de evolução cromossômica. Nas espécies de *Bambusa* e *Dendrocalamus* analisadas foram observadas variação inter e intraespecífica quanto ao número cromossômico de $2n = 58$ em *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Rivière & C. Rivière a $2n = 70 \pm 1$ em *Bambusa vulgaris* var. *vittata* Rivière & C. Rivière, além de variação na posição e número de bandas CMA/DAPI. Isto pode indicar que os diferentes números cromossômicos e níveis de ploidia para o grupo divergiram em eventos distintos, sendo o nível hexaploide aparentemente o mais estável. Os dados aqui reportados evidenciam a eficiência das técnicas citogenéticas na caracterização de espécies, destacando sua importância para os programas de melhoramento destas e de outras culturas, auxiliando na escolha de espécies e/ou cultivares com características agrônomicas de interesse buscando evitar problemas de incompatibilidade.

Palavras-chave: Citogenética, Mandioca, Bambu, Tipos Cromossômicos, Hexaploide.

ABSTRACT

Cytogenetic studies of species from genus *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae Juss.), *Bambusa* and *Dendrocalamus* (Poaceae Barnhart)

The Cytogenetics has been highlighted in several studies to be able to present substantial data of chromosomal constitution of a species. A simple chromosome characterization by conventional cytogenetic techniques can provide important information on number, morphology, chromosome size, interphase core type and pattern of prophase condensation, information that helps in understanding the phylogeny and evolution of species. Cytogenetic analysis of plant species of agronomic interest are of great value for understanding the evolution of these, as well as in the search for agronomic traits that may be assisted and / or controlled by the management in a breeding program. This information can support good strategies for breeding programs of cassava crops (Euphorbiaceae) and bamboo (Poaceae). These cultures stand out for its eating / commercial and industrial characteristics, respectively. In order to get information that can help in understanding evolution and formation and chromosome characterization, in addition to obtaining data that support breeding programs for these crops, species of the genera *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae), *Bambusa* and *Dendrocalamus* (Poaceae) were cytogenetically examined by conventional staining techniques and by fluorochromes (FISH). $2n = 36$ chromosomes were observed in all species of *Manihot* with morphology ranging from metacentric the submetacentrics being observed variation in the number and position of banding signals via staining by fluorochromes CMA / DAPI and rDNA 45S and 5S signals, providing a chromosome type index for characterization of the genus which these data can be applied to chromosomal evolution studies. In species of *Bambusa* and *Dendrocalamus* analyzed were observed inter- and intraspecific variation in the chromosome number of $2n = 58$ in *B. vulgaris* var. *vulgaris* Rivière & C. Rivière to $2n = 70 \pm 1$ in *B. vulgaris* var. *vittata* Rivière & C. Riviere, and variation in the position and number of CMA / DAPI bands. This may indicate that different numbers and chromosomal ploidy levels on the group diverged in distinct events, and the level hexaploid is apparently the most stable. The data reported here demonstrate the efficiency of cytogenetic techniques in the characterization of species, highlighting its importance for breeding programs of these and other cultures, assisting in the choice of species and / or cultivars with agronomic characteristics of interest seeking to avoid incompatibility issues.

Key words: Cytogenetics, Cassava, Bamboo, Chromosome Types, Hexaploidy.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de técnicas citogenéticas no estudo de espécies vegetais tem sido cada vez mais empreendida por diversos campos de pesquisa. Capaz de oferecer dados substanciais quanto à caracterização cromossômica, estas técnicas auxiliam cada vez na implementação de programas de melhoramento genético, que para ser efetivo, este deve consolidar o máximo de informações possíveis de uma determinada espécie e/ou cultivares. Neste sentido, as informações a respeito da diversidade genética dentro de uma cultivar são essenciais para uma implementação segura (GEPTS, 1993; MELO, 2009).

A simples caracterização cromossômica através de técnicas citogenéticas convencionais podem oferecer informações importantes sobre número, morfologia, tamanho cromossômico, tipo de núcleo interfásico e padrão de condensação profásico (GUERRA, 1988; STEBBINS, 1971), que podem auxiliar na compreensão da filogenia e evolução de espécies, desde que associada a outras abordagens como morfologia, características geográficas, etc (MELO, 2009; STEBBINS, 1971). Em contrapartida, uma caracterização citogenética mais detalhada possibilita a descrição clara da homologia cariotípica de uma determinada cultivar, variedade, híbrido ou espécie permitindo estabelecer relações de parentesco, identificar alterações numéricas e estruturais dos cromossomos e correlacioná-las com alterações fenotípicas, destacando-se assim, a citogenética aplicada a programas de melhoramento.

Análises citogenéticas de espécies vegetais de interesse agrônômico são de grande valia para a compreensão da evolução destas, bem como na busca de características agrônômicas que possam ser assistidas e/ou controladas pelo manejo em um programa de melhoramento. A família Poaceae destaca-se neste campo devido englobar diversas espécies economicamente importantes, havendo diversos estudos genéticos, tais como a cana-de-açúcar (D'HONT, 2005; EDMÉ et al., 2005; PORTIELES; RODRÍGUEZ; CORNIDE, 2004; PRICE, 1963), milho (ARNASON, 1936; BASS; BIRCHLER, 2012; DOUGLAS; WALDEN, 1974; LAMB; BIRCHLER, 2006), arroz (CHANG, 1964; LUAN et al., 2009; NAKAYAMA, 2005; SINGH, 2003; XIONG et al., 2006), trigo (BAO et al., 2012; CHRZASTEK, 2003; KHAN et al., 2005; MUJEEB-KAZI et al., 1989; RILEY, 1974; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2007), cevada (BASS; BIRCHLER, 2012; HOUBEN et al., 2007; SHE et al., 2007; SINGH, 2003). Além destas, destacam-se também os bambus na produção de celulose e derivados, bem como na construção civil (BANIK, 2015; K.M.WONG, 1989; LITTLE JR.; WADSWORTH, 1964; RAO et al., 1998; WONG, 2004; YUMING et al., 2004).

A subfamília Bambusoideae caracteriza-se principalmente pela morfologia de suas espécies, sendo consideradas as únicas gramíneas de porte arbóreo. Do ponto de vista citogenético, parece ser raro ocorrência de espécies diploides, sendo comum espécies poliploide de níveis variados de ploidia, tendo sido determinado que o número cromossômico básico para a subfamília é $X = 12$ (YEASMIN et al., 2015), para espécies de porte arbóreo, havendo triplóides, tetraplóides e hexaplóides com $2n = 36, 48, 72$, respectivamente, ao passo que no grupo dos bambus herbáceos o número básico mais comum parece ser $x = 11$ (JACOBS; EVERETT, 2000), embora $x = 7, 9, 10$ e 12 também tenham sido relatados (SODERSTROM, 1981; YEASMIN et al., 2015; ZHANG; CLARK, 2000). Estudos de bandeamento revelaram variação no número de sinais CMA+ em espécies consideradas próximas, sendo indicativo para estudos de caracterização e diferenciação de espécies. Ruiyang (2003) estudou citogeneticamente 185 espécies de 33 gêneros e seis (06) subtribos de bambu e encontrou variação cromossômica intra e interespecífica.

A família Euphorbiaceae também se destaca no cenário econômico, dando espaço para diversas pesquisas, tais como estudos genéticos, principalmente por espécies como a seringueira (AMMA; NAMBOODIRI; PANIKKAR, 1990; LEITCH et al., 1998; MARQUES; REIS; VICENTE, 2000) e a mamona (RAGHAVAN; ARORA, 1958; RAGHAVAN, 1957; SOONTORNCHAINAKSAENG; CHAIYASUT, 1999; VASCONCELOS et al., 2010). Na mesma direção, tem se destacado no cenário mundial a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), principalmente em países em desenvolvimento, devido esta espécie oferecer grande quantidade de amido, e apresentar alta adaptação a ambientes atingidos pela seca, sendo uma das principais fontes de alimento em países da África e do oriente médio.

Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Manihot* indicam uma alta estabilidade cariotípica com $2n = 36$ cromossomos muito similares entre si, variando de metacêntricos a submetacêntricos (CARVALHO; GUERRA, 2002; NASSAR, 2000a, 2000b). Análises de bandeamento e por fluorocromos revelaram a ocorrência de seis sinais CMA+ positivos co-localizados com sinais de sonda de DNAr 45S, além de dois sinais de DNAr 5S em um par cromossômico. Tais características podem variar entre espécies, mesmo em espécies consideradas próximas filogeneticamente, dando a possibilidade destas marcas serem utilizadas para caracterização de espécies, cultivares e/ou variedades agrônômicas, auxiliando em programas de melhoramento.

Com base no exposto acima, o presente trabalho objetivou analisar os cariótipos de variedades e cultivares de *Manihot esculenta* e espécies relacionadas, além de variedades e espécies da subfamília Bambusoideae com intuito de obter informações relevantes para a

caracterização destas espécies bem como buscar entender os processos evolutivos ocorridos nas mesmas, compilando ainda características que poderão ser usadas em programas de melhoramento genético.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Melhoramento de plantas e citogenética

O surgimento do melhoramento de plantas está intimamente relacionado com o surgimento do homem moderno, podendo ser considerado inicialmente como uma arte, devido ao intrincado processo de cultivo desenvolvido pelo homem - melhorista - na busca de características de interesse nos produtos que consumia, usando de ferramentas genéticas antes mesmo que as leis da genética fossem descobertas. Contudo, com a descoberta destes novos conhecimentos e o advento da Citogenética no início do século XX desenvolveu-se uma nova ciência acelerando o processo de melhoramento agrônômico (BELLWOOD et al., 2007; DIAMOND, 2002; JAUHAR, 2010). As ferramentas citogenéticas e moleculares tem auxiliado na manipulação das informações genéticas contidas nos cromossomos provando ser muito útil no melhoramento de plantas (BENAVENTE et al., 2008; JAUHAR, 2010), especialmente em cereais (ANAMTHAWAT-JÓNSSON; READER, 1995; BASS; BIRCHLER, 2012; CONTENTO; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2005; GUPTA; KULWAL; RUSTGI, 2005; JENKINS et al., 2008; JIANG et al., 1996; KOHLI et al., 2003; PATERSON; BOWERS; CHAPMAN, 2004; SINGH, 2003).

Durante o processo de implantação de um programa de melhoramento, os melhoristas devem obter o maior número de informações possíveis do material a ser estudado, sejam estas informações gerais e/ou específicas. Este processo é denominado *pré-melhoramento* e, neste ponto, a citogenética pode ser usada de forma estratégica a obtenção de dados que subsidiem os melhoristas e pesquisadores na implantação do programa. Destacam-se nesta perspectiva a caracterização da ploidia, a determinação da frequência de recombinação entre genomas homólogos e homeólogos, bem como a ocorrência de irregularidades espontâneas ou induzidas e as possíveis causas de irregularidades na segregação cromossômica que levam à produção de gametas inviáveis (DAVIDE et al., 2009).

A caracterização citogenética detalhada, como o mapeamento físico cromossômico, possibilita a descrição clara da homologia cariotípica de uma determinada cultivar, variedade, híbrido ou espécie permitindo estabelecer relações de parentesco, identificar alterações

numéricas e estruturais dos cromossomos e correlacioná-las com alterações fenotípicas e, ainda, avaliar o efeito de substâncias e/ou do estresse ambiental sobre o ciclo celular. De posse destas informações o melhorista pode incluir esses dados nos esquemas de cruzamento e retrocruzamento, contribuindo para minimizar possíveis erros de seleção de progênies, ou ainda, determinar o percentual dos genomas parentais nos indivíduos híbridos (DAVIDE et al., 2009; GUERRA; SOUZA, 2002; MELO, 2009).

Programas de melhoramento tem cada vez mais usado técnicas citogenéticas no melhoramento assistido por meio de hibridizações introgressivas, por exemplo (ANAMTHAWAT-JÓNSSON, 2001). Brammer (2009) sugere que quando genótipos instáveis, mas com elevado valor agrônômico, são detectados dentro de um programa de melhoramento, uma das alternativas é a seleção de linhas estáveis nos genótipos instáveis. Para tal, a seleção assistida via citogenética, pela técnica de GISH por exemplo, pode ser uma alternativa importantíssima. A caracterização genética de diferentes acessos de bancos de germoplasma constitui-se em uma importante fonte de dados para melhoristas destacando-se como um importante elo entre a conservação e utilização deste germoplasma, auxiliando na manutenção da biodiversidade dos recursos vegetais (GOYAL et al., 2012; NAYAK; ROUT; DAS, 2003; STAPLETON; RAO, 1995; YEASMIN et al., 2015), permitindo ainda um melhor gerenciamento do *pool* gênico, bem como uma seleção mais eficiente dos recursos genéticos, facilitando a detecção da real variabilidade genética para fins de melhoramento convencional ou com fins biotecnológicos, bem como de conservação (BENKO-ISEPPON, 2001).

2.2. Gênero *Manihot* Miller

2.2.1. Aspectos botânicos

O gênero *Manihot* Miller (Euphorbiaceae Juss.), nativo do continente americano, está distribuído desde os Estados Unidos até a Argentina sendo constituído por cerca de 100 espécies distribuídas em 19 seções, das quais 13 ocorrem no Brasil sendo também considerado um dos principais centros de diversificação biológica com cerca de 38 espécies, concentradas principalmente na região central do país (DA SILVA; BANDEL; MARTINS, 2003; NASSAR, 2000a, 2000b, 2006; ROGERS; APPAN, 1973). O Sudeste do México, Nordeste do Brasil e Bolívia compõem o segundo centro de diversidade. Outra área de ocorrência natural de muitas espécies no Brasil é a região amazônica (NASSAR, 2000b; OLSEN; SCHAAL, 2001). Morfologicamente são reconhecidas pelas folhas que em geral são lobadas, de tonalidades purpúreas, presença de látex e inflorescências racemosas ou paniculadas (ROGERS; APPAN, 1973). Suas espécies são perenes desenvolve-se em áreas abertas ou de florestas e apresentam

habito de crescimento desde ervas, subarbustos, arbustos e raramente árvores ou trepadeiras (CARMO JÚNIOR et al., 2013; JUDD, 2002; ROGERS; APPAN, 1973; SOARES; SALVIANO, 2000).

As folhas são membranáceas ou coriáceas, inteiras ou lobadas, apresentando de 3 a 11 lobos, lanceolados, obovados, ovados ou reniformes, o pecíolo apresenta cor e tamanhos variados (SOARES; SALVIANO, 2000). As inflorescências são do tipo racemo ou panícula, as flores estaminadas e pistiladas ocorrem na mesma planta, sendo as estaminadas na parte superior, monoclamídeas, cálice com cinco sépalas imbricadas e 10 estames. As flores pistiladas, na parte basal, são bem maiores, apresentam ovário súpero, tricarpelar e trilocular, com um óvulo em cada lóculo, estiletos em número de três, curtos e unidos entre si. O estigma é carnoso, ondulado e bem desenvolvido. O fruto é esquizocápáceo, tricoa, apresentando carpóforo, com deiscência septicida e loculicida, superfície geralmente lisa, podendo haver espécies com frutos alados. Os frutos amadurecem e secam depois de seis meses quando se abrem e expulsam as sementes a grandes distâncias. As sementes são carunculadas, apresentando superfície lisa e brilhante coberta por manchas escuras (CARVALHO; FUKUDA, 2006; ROGERS; APPAN, 1973).

2.2.2. Importância econômica

Embora os primeiros registros do cultivo de mandioca nas Américas datem de 1.400 anos a.C. em um pré-histórico vilarejo da civilização Maia em El Salvador, a origem da Mandioca é ainda incerta. No Brasil, foram encontradas gravuras de raízes semelhantes às de mandioca em um sítio arqueológico de Minas Gerais há aproximadamente 800 anos d.C. (FREITAS; MARTINS, 2003). Desde a publicação da Monografia do gênero *Manihot* (ROGERS; APPAN, 1973) que postulou que a mandioca surgiu de um híbrido de espécies resultado de eventos de hibridização entre diversas espécies, entre elas *M. aesculifolia* (Kunth) Pohl, endêmica da América Central, estudos taxonômicos e filogenéticos têm sido realizados na tentativa de apresentar relações filogenéticas mais claras para as espécies relacionadas (CARVALHO; GUERRA; CARVALHO, 1999; CARVALHO et al., 2009; COLOMBO; SECOND; CHARRIER, 2000a, 2000b; COLOMBO et al., 1998; DE CARVALHO; GUERRA, 2002; ELIAS; PANAUD; ROBERT, 2000; FREGENE et al., 1994; NASSAR, 2000b; OLSEN; SCHAAL, 1999, 2001; OLSEN, 2004; ROA et al., 1997, 2000). Allem (1994) propôs a hipótese de que a mandioca tenha surgido como espécie única, *M. esculenta*, com três subespécies reconhecidas: *Manihot esculenta* subsp. *esculenta*, sendo esta a espécie domesticada; e mais duas encontradas na natureza: *Manihot esculenta* subsp.

flabellifolia (Pohl) Ciferri e *Manihot esculenta* subsp. *peruviana* (Muell. Arg.) Allem, vindo a confirmar posteriormente a similaridade entre estas últimas em estudos moleculares (ALLEM et al., 2001). Léotard et al. (2009) propôs que a mandioca sofreu apenas um evento de domesticação e que sua relação com *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* parece ser recente, contudo com livre fluxo gênico, enquanto que para a espécie *M. pruinosa* não é sustentada a hipótese de hibridização. Alguns estudos, porém, mostram os estados do Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Acre como possíveis regiões brasileiras de domesticação da mandioca por populações indígenas (NASSAR, 2000a).

A introdução em outros continentes como o africano e o asiático se deu no século XVI com as grandes navegações (OLSEN; SCHAAL, 2001; ROGERS; APPAN, 1973), evento este que tornou a mandioca uma importante espécie cultivada. Em países em desenvolvimento, a mandioca é uma das maiores fontes de amido e derivados. É consumida por mais de 600 milhões de pessoas no mundo. Pode ser cultivada nas regiões tropicais e subtropicais devido a sua rusticidade e tolerância a solos pobres e a seca (CEBALLOS et al., 2004; EL-SHARKAWY, 2006). Dada sua importância socioeconômica, a mandioca vem obtendo um crescimento médio anual de 2,6%, passando de 97 milhões para 173 milhões de toneladas nos últimos anos. A produção brasileira de mandioca compreende cerca de 30 milhões de toneladas (FAO, 2014; WANG et al., 2014).

2.2.3. Estudos citogenéticos

O estudo e caracterização genética da diversidade e da relação entre diferentes espécies, populações e indivíduos é uma importante estratégia para o entendimento de questões evolutivas e citotaxonômicas, permitindo inferir sobre o comportamento de um determinado organismo o que pode auxiliar em programas de melhoramento. No gênero *Manihot*, por exemplo, as barreiras de isolamento reprodutivo são fracas, permitindo a ocorrência de hibridação interespecífica natural e artificial entre *M. esculenta* e espécies silvestres (NASSAR et al., 1995, 1996). Na natureza, sobretudo na região do semiárido brasileiro (caatinga), por exemplo, existem diversos prováveis híbridos (JENNINGS, 1963). Do ponto de vista Citogenético, todas as espécies do gênero *Manihot* analisadas até o presente momento apresentam um cariótipo estável com $2n = 36$ cromossomos pequenos e muito similares, variando de metacêntricos a submetacêntricos com fórmula cariotípica $16M(2Sat) + 2SM$, com heteromorfismo entre os cromossomos que apresentam satélites, além de seis sítios de DNAr 45S coincidindo com as bandas heterocromáticas CMA positivas e dois sítios de DNAr 5S em um par de homólogos (BAI; ASIEDU; DIXON, 1992; DE CARVALHO; GUERRA, 2002;

MAGOON; KRISHNAN; VIJAYA BAI, 1970; NASSAR; HAMRICK; FLEMING, 2002; NASSAR, 2000b). Espécies cultivadas de diversos gêneros têm sido caracterizadas por meio de várias técnicas citogenéticas contribuindo na identificação de marcadores cromossômicos, na dinâmica e comportamento dos genomas durante as diferentes fases do ciclo celular e, na identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, para reconstruir a história evolutiva do grupo ou para o desenvolvimento e construção de mapas genéticos (GILL; GILL; ENDO, 1993; GILL; GILL, 1994; GILL; HANS; JACKSON, 2008; PEDROSA; SCHWEIZER; GUERRA, 2000).

2.3. Subfamília Bambusoideae

2.3.1. Aspectos botânicos

A família Poaceae é uma das maiores entre as angiospermas. Possui cerca de 11.000 espécies distribuídas em diversas regiões fitogeográficas no mundo e em uma enorme variedade de habitats (CLAYTON; RENVOIZE, 1986; OSBORNE et al., 2011). Os bambus representam um dos grupos de monocotiledôneas arbóreas semelhantes a dicotiledôneas em termos de tamanho e tipo de ramificação, sendo o único com gramíneas arbóreas ocorrentes no mundo. Os gêneros arbóreos e herbáceos em relação à morfologia e anatomia são muito parecidos, sendo por isso, compreendidos na subfamília Bambusoideae (CALDERÓN; SODERSTROM, 1980).

A subfamília Bambusoideae destaca-se por conter espécies ocorrentes na floresta tropical estendendo-se até as regiões temperadas (DAHLGREN; CLIFFORD; YEO, 1985). As espécies ocorrentes na América do Sul são em sua maioria variedades herbáceas sendo a maior diversidade de espécies encontradas no Brasil (137 espécies) seguido por Colômbia (70), Venezuela (60), Equador (42) Costa Rica (39), México (37) e Peru (37) (LONDOÑO, 1996, 2001). No Brasil há a predominância de 89% dos gêneros e 65% das espécies que são relatados no Novo Mundo, sendo de origem asiática as espécies mais conhecidas. (DAS et al., 2008; FILGUEIRAS; GONÇALVES, 2004).

A subfamília Bambusoideae está dividida em tribos, levando-se em conta características da semente, anatomia das folhas, morfologia e número cromossômico. A tribo Bambusae, que inclui os bambus, foi agrupada na subfamília Bambusoideae quando estas características dos seus componentes foram comparadas com as características dos componentes das outras tribos, Panicoidae, Festucoidae e Choridoideae (RAO, 2000).

Quanto ao tipo de crescimento, há dois grupos de espécies de bambu: entoucerantes (paquimorfos) e alastrantes (leptomorfos). Os primeiros constituem a maioria das espécies

tropicais e subtropicais, como as dos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus*, *Thyrsostachys* e *Guandua*, todos introduzidos da Ásia, os quais se adaptam bem a temperaturas mais altas, tendo um considerável interesse para o Brasil (SALGADO, 1987).

2.3.2. Importância econômica

Tanto na Ásia quanto na América espécies de bambus são bastante visíveis como componentes típicos da flora com usos variados, sendo conhecido no oriente como planta dos mil usos, incluindo alimentação, uso medicinal, artesanato, construção, fabricação de papel, combate a erosão, recuperação ambiental, indústrias de cosméticos, entre outros, devido às suas excelentes características químicas, mecânicas e físicas (BANIK, 2015a; DRANSFIELD; WIDJAJA, 1995; K.M.WONG, 1989; WONG, 2004; YUMING et al., 2004). Além disso, é uma cultura ecológica, por apresentar baixos impactos ambientais, podendo ser usada como protetor e regenerador do solo (RAO et al., 1998). A sua elevada utilidade se deve às suas excelentes características de alta resistência mecânica e durabilidade dos colmos, tendo as vantagens do ciclo curto e da produção de colmos assexuadamente por muitos anos sem replantio (BANIK, 1988; LITTLE JR.; WADSWORTH, 1964).

As espécies de bambu ainda são pouco conhecidas e divulgadas na América Latina, pois países como Venezuela, Colômbia, Peru e Costa Rica, que têm grandes áreas florestais de bambu, fazem pesquisas muito restritas a seu uso na produção industrial e a sua exploração (HIDALGO-LOPEZ, 2003). No Brasil, dentre as espécies comerciais introduzidas, destaca-se *Bambusa vulgaris*, usada em reflorestamentos para a produção de celulose de fibra longa principalmente na região Nordeste, chegando a ocupar de 35.000 a 40.000 ha (TOMAZELLO FILHO; AZZINI, 1987). No estudo do potencial para fornecimento de fibras longas para a produção de papel *Kraft* pela indústria papeleira *Bambusa vulgaris* mostrou alto potencial devido à produção de fibras longas, em comparação a *Pinus elliottii* podendo ser usadas para a elaboração de embalagens de papel, atribuindo às mesmas elevada resistência ao rasgamento (LONDOÑO, 2001; OGUZILE; UWAJEH, 2009).

2.3.3. Estudos citogenéticos

Do ponto de vista citogenético, estudos feitos por Darlington e Wylie (1955) e Ueda (1960) na subfamília Bambusoideae demonstram serem raras espécies diplóides, sendo todas consideradas poliplóides de níveis variáveis, com número básico $X = 12$ (YEASMIN et al., 2015), para espécies de porte arbóreo, havendo triplóides, tetraplóides e hexaplóides com $2n = 36, 48, 72$, respectivamente. No grupo dos bambus herbáceos o número básico mais comum

parece ser $x = 11$ (JACOBS; EVERETT, 2000), embora $x = 7, 9, 10$ e 12 também tenham sido relatados (SODERSTROM, 1981; YEASMIN et al., 2015; ZHANG; CLARK, 2000). Em geral, o número total de cromossomos é de $2n = 48, 74$ ou até 96 , decrescendo gradualmente da zona tropical para a zona subtropical, sendo esperado que em regiões frias, assim como em altas latitudes e grandes altitudes $2n$ seja menor que 48 (GUANG-ZHU, 1985). Seijo e Fernandez (2003) afirmam que a localização e tamanhos das restrições secundárias podem ser um parâmetro da diversificação cariotípica entre as espécies, classificando-os como macro e microssatélites, estes últimos encontrados no presente trabalho.

Após uma análise detalhada em 185 espécies de 33 gêneros e seis (06) subtribos, Ruiyang (2003) reportou a variação nos números cromossômicos de algumas espécies de *Bambusa* e *Dendrocalamus*. Utilizando citometria de fluxo Gielis *et al.*, (1997) determinaram que o conteúdo de DNA genômico nas espécies de florestas tropicais é maior que nas espécies de florestas temperadas.

2.4. Técnicas citogenéticas

2.4.1. Coloração convencional

O tipo de coloração convencional mais utilizado é a técnica com uso do corante Giemsa. Embora simples, esta técnica permite marcar os cromossomos uniformemente, possibilitando a obtenção de vários dados cromossômicos como o número cromossômico de cada espécie, as medidas dos cromossomos (comprimento total da cromatina, comprimento dos braços curtos e longos) que permitem determinar os índices de assimetria, o índice centromérico e a razão entre os braços cromossômicos, sendo possível também a visualização de regiões satélites associada ao cromossomo (podendo estar ausente) e da região centromérica.

O índice centromérico ou a razão entre os braços cromossômicos pode ser usado para estabelecer a fórmula cariotípica dos cromossomos, classificada nas categorias: metacêntrico, submetacêntrico, telocêntrico e acrocêntrico (GUERRA, 1988). Segundo Guerra *et al.*, (1997), estes dados e o padrão de condensação e de coloração, podem fornecer informações valiosas para comparar espécies ou identificar variações inter e intraespecíficas. Melo (2011) encontrou variação no número cromossômico, no tamanho e no nível de ploidia para espécies do gênero *Solanum* L (Solanaceae) utilizando a coloração convencional, obtendo informações adicionais com auxílio de outras técnicas.

2.4.2. Coloração diferencial por fluorocromos

Em estudos citogenéticos, a caracterização do conjunto cromossômico de uma espécie

é fundamental e muitas vezes a coloração convencional é insuficiente para a diferenciação cromossômica intraespecífica e interespecífica, principalmente nas espécies que apresentam número e morfologia cromossômica semelhante. Devido a estas limitações, em meados da década de 1970 foram introduzidas as técnicas de bandeamento cromossômico à citogenética, permitindo assim uma caracterização citogenética com base na coloração diferencial de determinadas regiões nos cromossomos, o que permitiu identificar com mais clareza com base nesses padrões de coloração os pares de homólogos (SCHWARZACHER; AMBROS; SCHWEIZER, 1980).

Existem corantes que possuem propriedades fluorescentes com afinidade química a determinadas bases nucleotídicas. Podem ser encontrados fluorocromos com afinidade pelas bases adenina e timina (AT), como é o caso do 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), da quinacrina e do Hoechst 33258, e outros que coram as regiões ricas em guanina e citosina (CG), destacando-se a cromomicina A3 (CMA) e a mitramicina. Os corantes DAPI e o CMA são os mais empregados no estudo de cromossomos de plantas (KIM; PUNINA; RODIONOV, 2002; SUMMER, 2003). De Carvalho e Guerra (2002) observaram padrões de bandas semelhantes entre cultivares e espécies de *Manihot* ao utilizarem os corantes CMA/DAPI, sugerindo alta estabilidade cariotípica do gênero.

2.4.3. Hibridização Fluorescente *in situ* ó FISH

Nos últimos anos os estudos relacionados à área da genômica e citogenética de plantas tem progredido fortemente. Técnicas como a FISH tornaram-se rotineiras no mapeamento físico de sequências altamente repetitivas, tornando-se também aplicável às sequências de baixo número de cópias bem como sequências de cópia única (DOLEFIEL et al., 2014; HOUBEN; SCHUBERT, 2007). A FISH é hoje a forma de HIS (Hibridização *in situ*) mais utilizada na citogenética de plantas. Os avanços na preparação de amostras e processamento de imagens deram oportunidade para um aumento significativo na resolução e sensibilidade desta técnica (BASS; BIRCHLER, 2012).

Os fluorocromos mais utilizados na coloração da sonda são os Cy3, FITC, vermelho-Texas e rodamina. Para corar o DNA cromossômico total, usa-se mais comumente o DAPI ou o iodeto de propídeo. Sequências únicas ou repetitivas (organizadas em *tandem*) ou o DNA genômico total de um organismo podem ser usadas como sonda. Entretanto, as mais utilizadas são as de sequências repetitivas (DNAr 45S e 5S), devido ao fato de serem mais facilmente detectadas e proporcionarem sinais mais evidentes. Uma característica importante dos DNAr 5S e 45S (abrangendo as regiões 18S, 5.8S e 28S) é que a sequência de nucleotídeos desses

genes é muito conservada evolutivamente, o que significa que elas são muito similares em todos os eucariotas (GUERRA, 2004).

Nesta perspectiva, o uso da FISH pode subsidiar dados que auxiliem na reconstituição da formação de híbridos importantes em programas de melhoramento por exemplo, bem como na elucidação dos eventos evolutivos que causam mudanças na dinâmica e estrutura dos genomas.

Referências bibliográficas

- ALLEM, A. C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 41, p. 133-150, 1994.
- ALLEM, A. C. et al. The primary gene pool of cassava (*Manihot esculenta* Crantz subspecies *esculenta*, Euphorbiaceae). **Euphytica**, v. 120, n. 1, p. 127-132, 2001.
- AMMA, C. K. S.; NAMBOODIRI, A. N.; PANIKKAR, A. O. N. Meiotic Abnormalities in a Sterile Clone of *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. C. de fuss.) Muell. Arg. **CYTOLOGIA**, v. 55, p. 225-229, 1990.
- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. Molecular cytogenetics of introgressive hybridization in plants. **Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology**, v. 23, n. 1-3, p. 139-148, 2001.
- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; READER, S. M. Pre-annealing of total genomic DNA probes for simultaneous genomic in situ hybridization. **Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada**, v. 38, p. 814-816, 1995.
- ARNASON, T. Cytogenetics of hybrids between *Zea mays* and *Euchlaena mexicana*. **Genetics**, v. 21, p. 406-410, 1936.
- BANIK, R. L. Morphology and Growth. In: LIESE, W.; KÖHL, M. (Ed.). **Bamboo: the plant and its uses**. New Delhi, India: Springer International Publishing, 2015. v. 10p. 43-69.
- BAO, Y. et al. Molecular cytogenetic identification of a wheat (*Triticum aestivum*)-American dune grass (*Leymus mollis*) translocation line resistant to stripe rust. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 3, p. 3198-3206, 2012.
- BASS, H. W.; BIRCHLER, J. A. **Plant Cytogenetics**. New York, NY: Springer New York, 2012.
- BELLWOOD, P. et al. First Farmers: the Origins of Agricultural Societies. **Cambridge Archaeological Journal**, v. 17, n. 01, p. 87, 30 fev. 2007.
- BENAVENTE, E. et al. The use of cytogenetic tools for studies in the crop-to-wild gene transfer scenario. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3-4, p. 384-395, 2008.
- CALDERÓN, C. E.; SODERSTROM, T. R. The Genera of Bambusoideae (Poaceae) of the American Continent: Keys. **Smithsonian Contributions to Botany**, n. 44, p. 1-27, 1980.
- CARMO JÚNIOR, J. E. DO et al. *Manihot* (Euphorbiaceae s.s.) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, n. 4, p. 727-746, dez. 2013.
- CARVALHO, R. DE et al. Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot*. **Revista Raízes e Amidos**

Tropicais, v. 5, p. 6456650, 2009.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, n. 2, p. 1596168, 2002.

CARVALHO, R. DE; GUERRA, M.; CARVALHO, P. C. L. DE. Occurrence of Spontaneous Triploidy in *Manihot esculenta* Crantz. **CYTOLOGIA**, v. 64, n. 2, p. 1376140, 1999.

CEBALLOS, H. et al. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant molecular biology**, v. 56, p. 5036516, 2004.

CHANG, T.-T. **Rice Genetics and Cytogenetics** (The International Rice Research Institute, Ed.) Proceedings of the Symposium on Rice Genetics and Cytogenetics. **Anais...** Los Baños, Philippine: Elsevier Publishing Company, 1964

CHRZASTEK, M. Cytogenetic stability of wheat lines (*Triticum aestivum* L.) with added and substituted chromosomes of rye (*Secale cereale* L.). **Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica**, v. 45, n. 2, p. 1176126, 2003.

COLOMBO, C. et al. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz): I) RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, 1998.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germ plasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 1896199, 2000a.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. flabellifolia* and *M. peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 4176423, 2000b.

CONTENTO, A.; HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Diversity of a major repetitive DNA sequence in diploid and polyploid Triticeae. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 34642, 2005.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 27633, 2005.

DA SILVA, R. M.; BANDEL, G.; MARTINS, P. S. Mating system in an experimental garden composed of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) ethnovarieties. **Euphytica**, v. 134, n. 2, p. 1276135, 2003.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985.

DAS, M. et al. Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. **Advances in Botanical Research**, v. 47, n. 08, p. 2256268, 2008.

DAVIDE, L. C. et al. Citogenética e suas aplicações no melhoramento de plantas. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 53663, 2009.

DIAMOND, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 7006707, 8 ago. 2002.

DOLEFIEL, J. et al. Advances in plant chromosome genomics. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 1226136, 2014.

DOUGLAS, G. R.; WALDEN, D. B. Cytogenetic Studies of Chromosome Replication in *Zea mays* L. : Regulation of Homologue Synchrony. **Chromosoma**, v. 46, p. 13622, 1974.

EDMÉ, S. et al. Determination of DNA content and genome size in sugarcane. **J Am Soc Sugar Cane** , v. 25, p. 1616, 2005.

- ELIAS, M.; PANAUD, O.; ROBERT, T. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. **Heredity**, v. 85, n. February, p. 2196230, 2000.
- EL-SHARKAWY, M. A. International research on cassava photosynthesis, productivity, eco-physiology, and responses to environmental stresses in the tropics. **Photosynthetica**, v. 44, n. 4, p. 4816512, 2006.
- FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. P. S. A Checklist of the Basal Grasses and Bamboos in Brazil (POACEAE). **Bamboo Science and Culture**, v. 18, n. 1, p. 7618, 2004.
- FREGENE, M. A et al. Variability of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 89, n. 6, p. 719627, 1994.
- FREITAS, F. DE O.; MARTINS, P. S. Archaeological material for the study of crop evolution. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 2, p. 3996402, 2003.
- GEPTS, P. The Use of Molecular and Biochemical Markers in Crop Evolution Studies. **Evolutionary Biology**, v. 27, p. 51694, 1993.
- GILL, K. S.; GILL, B. S. Mapping in the realm of polyploidy: The wheat model. **BioEssays**, v. 16, n. 11, p. 8416846, nov. 1994.
- GILL, K. S.; GILL, B. S.; ENDO, T. R. A chromosome region-specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. **Chromosoma**, v. 102, n. 6, p. 3746381, 1993.
- GILL, N.; HANS, C. S.; JACKSON, S. An overview of plant chromosome structure. **Cytogenetic and genome research**, v. 120, n. 3-4, p. 1946201, 2008.
- GOYAL, A. K. et al. International Journal of Fundamental & Applied Sciences Inventorying bamboo biodiversity of North Bengal : A Case Study. v. 1, n. 1, p. 7610, 2012.
- GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Guanabara Koogan S. A., 1988.
- GUERRA, M. **FISH - Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. DE. **Como observar cromossomos : um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal, e humana**. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.
- GUPTA, P. K.; KULWAL, P. L.; RUSTGI, S. Wheat cytogenetics in the genomics era and its relevance to breeding. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-3, p. 315627, 2005.
- HIDALGO-LOPEZ, O. Physical - Mechanical and Chemical Properties. In: **Bamboo: the gift of the gods**. Bogotá, Colombia: [s.n.]. p. 726103.
- HOUBEN, A. et al. CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. **Chromosoma**, v. 116, n. 3, p. 2756283, 2007.
- HOUBEN, A.; SCHUBERT, I. The cytogenetics and genomics of crop plants. **Chromosome Research**, v. 15, n. 1, p. 162, 2007.
- JAUHAR, P. P. Genetic control of chromosome behaviour: Implications in evolution, crop improvement, and human biology. **The Nucleus**, v. 53, n. 1-2, p. 3612, 2010.
- JENKINS, G. et al. Meiotic genes and proteins in cereals. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3-4, p. 2916301, 2008.

- JENNINGS, D. L. Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava, and the effect of interspecific crossing on fertility. **Euphytica**, v. 12, n. 1, p. 69676, 1963.
- JIANG, J. et al. A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of cereal chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 14210614213, 1996.
- JUDD. Classification and System in Flowering plants: Historical Background. In: **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. 2. ed. [s.l: s.n.]. p. 41653.
- K.M.WONG. Current and Potential Uses of Bamboo in Peninsular Malaysia. **J. Amer. Bamboo Soc.**, v. 7, n. 1&2, p. 1615, 1989.
- KHAN, A. A. et al. Review Cytogenetics and Evolution of *Triticum aestivum* L. em Thell. **Int. J. Agri. Biol**, v. 07, n. 3, p. 5276534, 2005.
- KIM, E. S.; PUNINA, E. O.; RODIONOV, A. V. Chromosome CPD (PI / DAPI) - and CMA / DAPI-Banding Patterns in *Allium cepa* L . **Russian Journal of Genetics**, v. 38, n. 4, p. 3926398, 2002.
- KOHLI, A. et al. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 2, p. 2476258, 2003.
- LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Retroelement genome painting: Cytological visualization of retroelement expansions in the genera *zea* and *tripsacum*. **Genetics**, v. 173, n. 2, p. 10076 1021, 2006.
- LEITCH, A. et al. Molecular cytogenetic studies in rubber, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). **Hevea brasiliensis**, v. 41, n. Wycherley 1976, p. 4646467, 1998.
- LITTLE JR., E. L.; WADSWORTH, F. H. **Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands**. [s.l.] U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, 1964.
- LONDOÑO, X. Diversity and distribution of New World bamboos: with special emphasis on the Bambuseae. **INBAR Working Paper No. 8**, n. 8, p. 1631, 1996.
- LONDOÑO, X. Evaluation of bamboo resources in latin america. **International Network for Bamboo and Rattan INBAR**, v. 35, n. 96, p. 30, 2001.
- LUAN, L. et al. A comparative cytogenetic study of the rice (*Oryza sativa* L.) autotetraploid restorers and hybrids. **Russian Journal of Genetics**, v. 45, n. 9, p. 107461081, 2009.
- MAGOON, M. L.; KRISHNAN, R.; VIJAYA BAI, K. Cytogenetics of the F1 hybrid between cassava and ceara rubber, and its backcross. **Genetica**, v. 41, n. 1, p. 4256436, 1970.
- MARQUES, J. R. B.; REIS, W.; VICENTE, M. POLIPLOIDIA EM SERINGUEIRA : III - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE CLONES DIPLÓIDES E NOVOS POLIPLÓIDES PUTATIVOS EM CONDIÇÕES DE JARDIM CLONAL. **Agrotrópica**, v. 12, n. 1, p. 4548, 2000.
- MELO, C. A. F. DE. **Estudo citogenético e molecular em nove espécies do gênero *Solanum* L. (Solanaceae Juss.)**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.
- MUJEEB-KAZI, A. et al. Production and cytogenetics of *Triticum aestivum* L. hybrids with some rhizomatous *Agropyron* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, n. 2, p. 1626168, 1989.
- NAKAYAMA, S. Molecular cytological diversity in cultivated rice *Oryza sativa* subspecies japonica and indica. **Breeding Science**, v. 55, n. 4, p. 4256430, 2005.
- NASSAR, H. N. et al. Cytogenetic behaviour of the interspecific hybrid of *Manihot neusana* Nassar and cassava , *M. esculenta* Crantz , and its backcross progeny. **Journal of Plant**

Science, v. 75, p. 6756678, 1995.

NASSAR, J. M.; HAMRICK, J. L.; FLEMING, T. H. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). **The Journal of heredity**, v. 93, n. 3, p. 1936200, 2002.

NASSAR, N. M. A. Wild cassava, *Manihot* spp.: Biology and potentialities for genetic improvement. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 2016212, 2000a.

NASSAR, N. M. A. et al. Induction of a productive aneuploid in cassava, *M. esculenta* Crantz. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 125, p. 1236125, 1996.

NASSAR, N. M. A. Cytogenetics and evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 100361014, dez. 2000b.

NASSAR, N. M. A. Cassava genetic resources: Extinct everywhere in Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 5, p. 9756983, 2006.

NAYAK, S.; ROUT, G. R.; DAS, P. Evaluation of the genetic variability in bamboo using RAPD markers. **Plant and Soil**, v. 2003, n. 1990, p. 24628, 2003.

OGUZILE, O.; UWAJEH, C. F. Evaluation of the pulp and paper potential of a Nigerian grown *Bambusa vulgaris*. **World Applied Sciences Journal**, v. 6, n. 4, p. 5366541, 2009.

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 5176526, nov. 2004.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. May, p. 558665591, 1999.

OLSEN, K.; SCHAAL, B. 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, n. 1, p. 131642, jan. 2001.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; CHAPMAN, B. A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 990368, 2004.

PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 3-4, p. 3616367, 16 fev. 2000.

PORTIELES, R.; RODRÍGUEZ, R.; CORNIDE, M. T. Cytogenetic characterization of new wild clones of the *Saccharum* complex. **Cultivos Tropicales**, v. 25, n. 1, p. 17622, 2004.

PRICE, S. Cytogenetics of modern sugar canes. **Economic Botany**, v. 17, n. 2, p. 976106, 1963.

RAGHAVAN, R. S. CHROMOSOME NUMBERS IN INDIAN MEDICINAL PLANTS. **Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B**, p. 2946298, 1957.

RAGHAVAN, R. S.; ARORA, C. M. Chromosome numbers in Indian medicinal plants. II. **Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B**, v. 47, n. 6, p. 3526358, 1958.

RAO, A N. et al. **Priority species of bamboo and rattan**. Serdang, Malaysia: IPIGRI and INBAR, 1998.

RILEY, R. Cytogenetics of chromosome pairing in wheat. **Genetics**, v. 78, n. 1, p. 1936203, 1974.

- ROA, A. C. et al. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 5-6, p. 7416750, 23 out. 1997.
- ROA, A. C. et al. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American journal of botany**, v. 87, n. 11, p. 1647655, nov. 2000.
- SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Plant Systematics and Evolution**, v. 134, n. 3-4, p. 2936297, 1980.
- SHE, C. et al. The distribution of repetitive DNAs along chromosomes in plants revealed by self-genomic in situ hybridization. **Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao**, v. 34, n. 5, p. 437648, 2007.
- SINGH, R. J. **Plant Cytogenetics**. 2. ed. Boca Raton, Florida: [s.n.].
- SOARES, J. G. G.; SALVIANO, L. M. C. **Cultivo da maniçoba para produção de forragem no semiárido brasileiro** Petrolina Embrapa Semi-Árido, , 2000.
- SODERSTROM, T. R. Some Evolutionary Trends in the Bambusoideae (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 68, n. 1, p. 15647, 1981.
- SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; CHAIYASUT, K. Cytogenetic investigation of some Euphorbiaceae in Thailand. **Cytologia**, v. 64, n. 3, p. 2296234, 1999.
- STAPLETON, C. M. A.; RAO, V. R. **Progress and prospects in genetic diversity studies on bamboo and its conservation** (I.V. Ramanuja Rao and Cherla B. Sastry, Ed.) Bamboo, People and the Environment: Proceedings of the Vth International Bamboo Workshop and the IV International Bamboo Congress. **Anais...** Ubud, Bali, Indonesia: International Development Research Center (IDRC) International Network for Bamboo and Rattan (INBAR) Government of the Netherlands Environmental Bamboo Foundation (EBF) International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 1995
- STEBBINS, G. L. Chromosomal evolution in higher plants. **Chromosomal evolution in higher plants.**, v. 44, n. 0, p. 233, 1971.
- SUMMER, A. T. **Chromosomes - Organization and Function**. 1. ed. North Berwick, United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2003.
- TOMAZELLO FILHO, M.; AZZINI, A. Estrutura anatomica, dimensoes das fibras e densidade basica de colmos de *Bambusa vulgaris* Schrad. **IPEF (Atual Scientia Forestalis)**, v. 36, p. 43650, 1987.
- VASCONCELOS, S. et al. Heterochromatin and rDNA 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). **Micron**, v. 41, n. 7, p. 7466753, 2010.
- WANG, L. et al. Cytogenetic and molecular identification of three *Triticum aestivum*-*Leymus ramosus* translocation addition lines. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 36, n. 6, p. 3796385, 2009.
- WANG, W. et al. Cassava genome from a wild ancestor to cultivated varieties. **Nature communications**, v. 5, p. 5110, 2014.
- WONG, K. M. **Bamboo, the amazing grass: a guide to the diversity and study of bamboos in Southeast Asia**. Selangor Darul Ehsan, Malaysia: Rimba Ilmu Botanic Garden, Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 2004.
- XIONG, Z. Y. et al. Cytogenetic comparisons between A and G genomes in *Oryza* using

genomic in situ hybridization. **Cell research**, v. 16, n. 3, p. 26066, 2006.

YEASMIN, L. et al. Bamboo: an overview on its genetic diversity and characterization. **3 Biotech**, v. 5, n. 1, p. 1611, 2015.

YUMING, Y. et al. Bamboo Diversity and Traditional Uses in Yunnan, China. **Mountain Research and Development**, v. 24, n. 2, p. 1576165, 2004.

ZHANG, P. et al. Cytogenetics in the age of molecular genetics. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 58, n. 6, p. 4986506, 2007.

**CAPÍTULO
II**

Caracterização, morfometria e tipologia cromossômica em espécies de *Manihot* Mill.

**Artigo a ser submetido à Revista Pesquisa
Agropecuária Brasileira ó PAB (ISSN: 1678-
3921)**

1 **Caracterização, morfometria e tipologia cromossômica em espécies de *Manihot* Mill.**

2 David Oliveira da Silva⁽¹⁾, Genialdo Ramos dos Santos⁽²⁾, Ariana Silva Santos⁽³⁾, Alfredo
3 Augusto Cunha Alves⁽⁴⁾, Reginaldo de Carvalho⁽²⁾

4 ⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Rua Dom Manoel
5 de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 ó Recife, PE, Brasil. E-mail:
6 david.oliveiras@ufrpe.br ⁽²⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
7 Biologia, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 ó Recife, PE,
8 Brasil. E-mail: genialdobiomat@gmail.com, reginaldo.ufrpe@gmail.com ⁽³⁾Universidade
9 Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, CEP: 44380-000, Cruz das Almas, BA,
10 Brasil. E-mail: ana.silva0491@hotmail.com ⁽⁴⁾Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária,
11 Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa s/n, Cx Postal 007, Vitória, CEP: 44380000,
12 Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: aalves@cnpmf.embrapa.br

13 **Resumo:** A mandioca pertence ao gênero *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) e é considerada uma
14 das espécies cultivadas de maior importância em países em desenvolvimento e uma das maiores
15 fontes de amido e derivados. Do ponto de vista citogenético, as espécies do gênero apresentam
16 cariótipo estável. Entretanto, sutis variações podem ser observadas por meio de marcadores
17 citogenéticos. No presente trabalho, 14 acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e 10
18 espécies relacionadas foram analisadas citogeneticamente por meio da coloração convencional,
19 coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ e 4ø 6 diamidino-2-fenil indol e hibridização
20 in situ fluorescente (FISH) com sondas de DNAr 5S e 45S. Foi observado número
21 cromossômico diploide $2n = 36$ com cromossomos de meta a submetacêntricos, tamanho médio
22 de cerca de 1,12 µm e quatro cromossomos com satélite. A coloração com os fluorocromos
23 CMA e DAPI revelou um número frequente de seis bandas CMA⁺ terminais. Nenhuma banda
24 DAPI⁺ foi observada. A FISH evidenciou sinais de DNAr 45S colocalizados com as bandas
25 CMA⁺. Os sinais de 5S não tiveram correspondência com as bandas CMA. Variações quanto

26 ao número e posições das bandas CMA+, sítio de DNAr 5S e 45S foram observadas. Com base
27 nestes resultados desenvolvemos uma nomenclatura de *Tipos Cromossômicos* para *Manihot*
28 atribuindo uma melhor caracterização e reconhecimento dos cromossomos entre as espécies do
29 gênero, sendo possível utilizar estes resultados em estudos filogenéticos, citotaxonômicos e de
30 melhoramento genético.

31 Termos para indexação: Mandioca, Citogenética, Tipos Cromossômicos, Euphorbiaceae.

32 **Characterization, morphometry and chromosomal typology of species of *Manihot* Mill.**

33 Abstract: Cassava belongs to the genus *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) and is considered one
34 of the most important cultivated species in developing countries and a major source of starch
35 and starch derivatives. Into a Cytogenetic approach, the *Manihot* genus presents stable
36 karyotype. However, smooth variations can be observed by means of cytogenetic markers. In
37 this study, 14 cassava accessions (*Manihot esculenta* Crantz) and 10 related species were
38 analyzed cytogenetically by conventional staining, staining by fluorochromes chromomycin A₃
39 and 4', 6-diamidino-2-phenyl indole and fluorescent in situ hybridization (FISH) with probes
40 of rDNA 5S and 45S. It was observed diploid chromosome number $2n = 36$ chromosomes
41 ranging from meta to submetacentrics with average size of about 1.12 μm and four
42 chromosomes with satellites. Staining with fluorochromes CMA and DAPI revealed a frequent
43 number of six CMA⁺ terminal bands. No DAPI⁺ band was observed. FISH of 45S rDNA probes
44 showed signs colocalized with CMA⁺ bands. The 5S signals had no correspondence with the
45 CMA bands. Variations in the number and positions of the CMA⁺ bands and in the rDNA 5S
46 and 45S sites were observed. Based on these results we developed a nomenclature of
47 Chromosome Types for *Manihot* giving a better characterization and recognition of
48 chromosomes between species of the genus, being possible the usage of these results in
49 phylogenetic studies, cytotaxonomic and breeding.

50 Index terms: Cassava, Cytogenetics, Chromosome Types, Euphorbiaceae.

51 **Introdução**

52 A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) é uma importante cultivar em países em
53 desenvolvimento e uma das maiores fontes de amido e derivados, sendo consumida por mais
54 de 600 milhões de pessoas no mundo. Citogeneticamente, todas as espécies do gênero *Manihot*
55 Mill. já analisadas apresentam cariótipo estável com $2n = 36$ cromossomos pequenos e
56 similares, variando de metacêntricos a submetacêntricos com seis sítios de DNAr 45S
57 coincidindo com as bandas heterocromáticas CMA⁺ e dois sítios de DNAr 5S em um par de
58 homólogos (Nassar 2000b; Carvalho & Guerra 2002). Espécies cultivadas de diversos gêneros
59 tem sido caracterizadas citogeneticamente contribuindo na identificação de marcadores
60 cromossômicos, na dinâmica e comportamento dos genomas durante as diferentes fases do ciclo
61 celular e, na identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, para reconstruir
62 a história evolutiva do grupo ou para o desenvolvimento e construção de mapas genéticos (Gill
63 & Gill 1994; Pedrosa et al. 2000).

64 Mesmo em gêneros com cariótipo estável e cromossomos pequenos, como *Citrus* L. (M
65 Guerra, 1993) e *Phaseolus* L. (Moscone, Klein, Lambrou, Fuchs, & Schweizer, 1999), tem sido
66 possível identificar diferenças citogenéticas entre espécies. Um modelo de *tipos cromossômicos*
67 para o gênero *Citrus* foi desenvolvido por Guerra (1993) auxiliando na caracterização de
68 diferentes espécies do gênero bem como por Urdampilleta et al. (2015) na tribo Cestreae.

69 Nosso trabalho analisou acessos de *Manihot esculenta* e espécies relacionadas via
70 coloração com CMA/DAPI e FISH comparando aos dados da literatura a fim de identificar
71 marcas cromossômicas que possibilitem o desenvolvimento de um sistema de classificação
72 cromossômica no gênero *Manihot*.

73 **Material e Métodos**

74 Foram analisados 14 acessos de *Manihot esculenta*, além de outras 10 espécies
75 selvagens apresentadas na Tabela 1. As espécies foram cultivadas em vasos na casa de
76 vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

77 ***Coloração convencional***

78 Para a coloração convencional foram utilizadas raízes jovens pré-tratadas com 8-
79 hidroxiquinoleína por 4 horas a temperatura ambiente, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido
80 acético glacial) por um período de 24 horas, e estocadas no freezer até posterior análise. Para
81 coloração convencional, as lâminas foram preparadas pela técnica do esmagamento em uma
82 gota de ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula e
83 coradas com Giemsa 2% (Guerra e Souza 2002).

84 ***Coloração com fluorocromos CMA/DAPI***

85 Para a coloração com fluorocromos foi adotada a metodologia de Schweizer e Ambros
86 (1994). As raízes foram digeridas entre duas e três horas em uma solução de celulase (2%) e
87 pectinase (20%) a 37°C e, posteriormente, esmagadas em ácido acético a 45%. As lâminas
88 foram envelhecidas por três dias em temperatura ambiente e, posteriormente, coradas com
89 CMA a 0,5 mg/mL, por 60 minutos e novamente coradas com DAPI 2 g/ml por 30 minutos e,
90 finalmente, montadas em tampão McIlvaine-glicerol 1:1 (v/v).

91 ***Hibridização fluorescente in situ - FISH***

92 Para localizar os sítios de DNAr por FISH, o clone (D2) contendo um fragmento de 500
93 pb proveniente da região do DNAr 5S de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Fabaceae)
94 (Pedrosa et al. 2002), e o clone (R2), um fragmento de 6,5 kb correspondente ao DNAr 18S-
95 5,8S-25S de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck, Schbfer, Schweizer, & Bachmair, 1997)
96 foram marcados com Cy3-dUTP (Amersham) e utilizados como sondas. O protocolo de FISH
97 foi realizado como descrito por Pedrosa et al. (2002).

98

Fotodocumentação e caracterização cromossômica

99 As melhores células foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Leica DM
100 2500 equipado com câmera digital DFC 345FX utilizando-se para processamento das imagens
101 o software CW 4000. As imagens foram editadas e montadas no software Adobe Photoshop
102 CS5 utilizando-se do brilho e contraste. A montagem dos ideogramas foi feita utilizando os
103 softwares Corel DRAW X7 e Adobe Photoshop CS5. As medições cromossômicas foram feitas
104 usando o software livre MicroMeasure v. 3.3
105 (www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure).

106 Para caracterização do cariótipo foram analisadas a morfometria com base na média do
107 índice centromérico (IC), tamanho dos braços, curto (b) e longo (B), razão entre os braços curto
108 e longo (R), além do comprimento médio cromossômico CMC). A nomenclatura adotada para
109 a morfologia cromossômica foi a de Levan et al. (1964), sendo M para metacêntricos (IC=50.0-
110 40.1), SM para submetacêntricos (IC = 40.0-25.1), A para acrocêntricos (IC = 25.1-0.01) e T
111 para telocêntricos (IC = 0.00).

112

Resultados e Discussão

113 Todas as espécies analisadas apresentaram $2n = 36$ cromossomos pequenos e muitos
114 similares morfologicamente, variando de metacêntricos a submetacêntricos (Fig. 1), com
115 tamanhos cromossômicos variando de 0,547 a 1,68 μm no Clone 83194 de *Manihot esculenta*
116 (menor) a 0,580 a 1,989 μm no acesso BGM 1444 (maior), com média de 1,117 μm como
117 apresentado na tabela 2. Resultados similares foram relatados por outros autores para diversas
118 espécies de *Manihot* (Abraham 1944; Magoon et al. 1970; Nassar 1980; Bai et al. 1992;
119 Carvalho & Guerra 2002; Santos et al. em publicação), sendo relatado apenas dois trabalhos
120 reportando triploidia espontânea no gênero revelando $2n = 54$ (Sardos et al., 2009), onde

121 Carvalho et al. (1999) determinou o número cromossômico $2n = 54$ para a espécie *Manihot*
122 *esculenta*, =Manipebaø

123 Como reportado por Carvalho & Guerra (2002), o presente trabalho também encontrou
124 variação na condensação de alguns pares cromossômicos em algumas espécies, onde um dos
125 braços se condensam mais rapidamente, enquanto o outro permanece distendido (Fig 1a, b, e,
126 g,). Isso sugere que possam existir diferentes tipos de cromatina entre espécies e/ou variedades
127 de *Manihot*. Este tipo de observação também foi encontrado em trabalhos para outras espécies
128 vegetais (A. C. Brasileiro-Vidal, Melo-Oliveira, Carvalheira, & Guerra, 2009; Marques, Roa,
129 & Guerra, 2010). A ocorrência de satélites também foi registrada (Fig 1e, j, n, r). A fig 1k
130 mostra uma célula incompleta, porém na mesma é possível ter uma boa distinção da morfologia
131 cromossômica observada no gênero.

132 A co-localização da heterocromatina dos diferentes cariótipos de *Manihot* com os sítios
133 de DNAr 45S e bandeamentos C foram previamente descritos na literatura, exibindo seis blocos
134 CMA⁺ em três pares cromossômicos correspondendo a esses mesmo sinais (Carvalho &
135 Guerra, 2002). Tais características também foram encontradas em outras espécies vegetais (Las
136 Peñas, Urdampilleta, Bernardello, & Forni-Martins, 2009). A presente análise revelou um
137 padrão similar para todas as espécies analisadas, com exceção das espécies *M. dichotoma* (fig
138 2i) que revelou doze (12) bandas CMA⁺, *M. reflexifolia* com sete sinais CMA⁺ em três pares
139 cromossômicos, sendo em um cromossomo de um dos pares encontrada duas bandas CMA⁺
140 nas regiões terminais de ambos os braços cromossômicos (Fig 2j) e híbridos naturais *M.*
141 *esculenta* e *M. reflexifolia* (Fig 2k). Este último dado é inédito para o gênero e permite inferir
142 sobre a usabilidade das técnicas de bandeamento para diferenciação e/ou caracterização de
143 espécies bem como em programas de melhoramento. Em alguns preparados foi possível
144 observar bandas DAPI⁺ em um ou dois pares cromossômicos na espécie *M. leptophylla*. Este
145 tipo de ocorrência foi registrado em espécies de *Manihot* por Carvalho & Guerra (2002).

146 As marcações reveladas por sondas de DNAr 45S foram correspondentes às regiões
147 CMA+, apresentando seis sinais nas regiões terminais dos cromossomos de todas as espécies
148 exceto em *M. dichotoma* que apresentou sete sinais e em *M. leptophylla* que apresentou seis
149 sinais, sendo quatro pericentroméricos e dois sinais menores terminais (Fig 2 i, f). Em espécies
150 evolutivamente mais próximas a variação interespecífica do número e posição dos sítios de
151 DNAr 45S é geralmente maior, ao contrário do que ocorre com os sítios de DNAr 5S (Berjano,
152 Roa, Talavera, & Guerra, 2009; Fregonezi, Fernandes, Torezan, Vieira, & Vanzela, 2006;
153 Pedrosa-Harand et al., 2006; Ran, Hammett, & Murray, 2001; Weiss-Schneeweiss,
154 Tremetsberger, Schneeweiss, Parker, & Stuessy, 2008). Contudo, a existência de espécies que
155 compartilham as mesmas características como mesmo número cromossômico, nível de ploidia
156 e padrões de distribuição de sítios de DNAr 45S, não implica serem estas necessariamente
157 próximas umas das outras (M. Guerra, 2008; Lysak et al., 2006). O estudo filogenético mais
158 recente para o gênero *Manihot* foi proposto por Duputié et al. (2011) onde ficaram agrupadas
159 num mesmo clado com alto suporte estatístico as espécies *M. dichotoma* e *M. glaziovii*, que no
160 presente trabalho apresentaram diferenças quanto ao número de sítios de DNAr 45S, sete e seis
161 respectivamente.

162 As espécies *Manihot esculenta* var. *mandiocaba*, *M. dichotoma* e *M. glaziovii*
163 apresentaram dois sítios de DNAr 5S na região terminal de um par cromossômico (Fig 2 c, g,
164 i). Resultados similares foram reportados por Carvalho & Guerra (2002) e Santos et al. (em
165 publicação). Tal característica denota ser este sítio aparentemente conservado entre as espécies,
166 o que pode ser esperado em cariótipos estáveis (Adams, Leitch, Bennett, Chase, & Leitch,
167 2000). A exceção foi para a espécie *M. glaziovii* subsp. *noronhense* que apresentou três sinais
168 de DNAr 5S, dois na região terminal de um par cromossômico e um outro sinal na região
169 pericentromérica de um outro cromossomo (Fig 2h). Tal ocorrência ainda não é bem entendida.

170 O número de sítios de DNAr pode também ajudar a reconhecer o nível de ploidia de
171 uma espécie (DeHont, Ison, Alix, Roux, & Glaszmann, 1998; M. Guerra, 2008; Marcelo Guerra,
172 2004), embora essa correlação nem sempre seja evidente. Pequenas variações cromossômicas,
173 embora sutis, podem ser suficientes para diferenciar espécies e/ou variedades agronômicas, o
174 que é uma característica importante quando da análise de espécies com cromossomos pequenos
175 e similares morfológicamente (M. Guerra, 2008). Por meio de técnicas de bandeamento
176 CMA/DAPI em conjunto com dados morfométricos, Guerra (1993) propôs uma classificação
177 de tipos cromossômicos de *Citrus* L. para auxiliar na caracterização de espécies do gênero,
178 expandindo sua aplicabilidade tanto para fins de melhoramento quanto para estudos de
179 evolução e citotaxonomia, vindo a ser revisada e utilizada em estudos subsequentes (A. C.
180 Brasileiro-Vidal, Dos Santos-Serejo, Soares Filho, & Guerra, 2007; R. Carvalho, Soares Filho,
181 Brasileiro-Vidal, & Guerra, 2005; Cornélio et al., 2003; Yamamoto et al., 2007; Yamamoto,
182 Abkenar, Matsumoto, Kubo, & Tominaga, 2008).xø Abordagem similar foi realizada por
183 Kenton et al. (1993) na caracterização de *Nicotiana tabacum* L., Urdampilleta et al. (2015) e
184 Fernandes et al. (2009) na diferenciação cromossômica de espécies da família Solanaceae.

185 Embora o gênero *Manihot* não apresente diferenciação quanto o número de
186 cromossomos e sua morfologia, bem como tenha uma estabilidade no número de bandas
187 CMA+, sítios de DNAr 45S e 5S, é possível encontrar em alguns casos diferenciação destes
188 sinais. Tal característica pode ser utilizada como parâmetro na caracterização de espécies e
189 acessos e/ou variedades agronômicas para fins filogenéticos ou de melhoramento genético.

190 Com base nos resultados obtidos no presente trabalho e em consulta à literatura, além
191 da colaboração de outros pesquisadores propomos um índice de tipos cromossômicos
192 encontrados em espécies do gênero *Manihot* (Fig 3). Dada a similaridade entre os cariótipos
193 quanto à forma e número, um índice desta natureza pode auxiliar na identificação cromossômica
194 de espécies do gênero, podendo ainda ser utilizado como parâmetro filogenético. Embora não

195 tenha usado um modelo idêntico, por meio de características cariotípicas (Souza, Crosa, &
196 Guerra, 2010) indicou a circunscrição de espécies do gênero *Ipheion* Rafinesque. Com base
197 neste tipo de parâmetro os autores puderam confirmar que as espécies de *Nothoscordum* Kunth
198 por eles estudadas e agrupadas dentro do gênero *Ipheion* estavam mais proximamente
199 relacionadas com outras espécies de *Nothoscordum*.

200 **Conclusões**

201 Detalhamentos refinados no cariótipo de *Manihot* como utilização de sondas de
202 sequências repetitivas do genoma ainda são pendentes e podem corroborar ainda mais a
203 caracterização de diferentes tipos cromossomos no gênero como por exemplo o realizado por
204 (She, Liu, Diao, Hu, & Song, 2007) onde analisando a distribuição dos DNAs repetitivos ao
205 longo dos cromossomos de diversas espécies, conseguiu caracterizar alguns cromossomos
206 específicos, em especial no cariótipo da cevada, que foi possível diferenciar cada um dos sete
207 homólogos. Mesmo sendo este tipo de análise sendo mais promissor em espécies com
208 cromossomos grandes, a avaliação e caracterização destas sequências são de grande
209 importância para o entendimento dos eventos evolutivos ocorridos em *Manihot*, por exemplo.

210 Nesta perspectiva, a nomenclatura de *Tipos Cromossômicos* é uma importante
211 ferramenta na caracterização do gênero *Manihot* por atribuir uma identidade própria aos
212 diferentes cariótipos existentes.

213 **Agradecimentos**

214 Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
215 Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de mestrado. À Universidade Federal Rural
216 de Pernambuco em nome dos coordenadores dos departamentos de Agronomia e Botânica,
217 pelos espaços cedidos para execução deste trabalho e a EMBRAPA Mandioca e Fruticultura
218 Tropical pela disponibilização dos materiais para pesquisa.

219

Referências bibliográficas

- 220 ADAMS, S. P., LEITCH, I. J., BENNETT, M. D., CHASE, M. W., & LEITCH, A. R.
221 Ribosomal DNA evolution and phylogeny in Aloe (Asphodelaceae). **American Journal**
222 **of Botany**, v. 87(11), 157861583, 2000.
- 223 BERJANO, R., ROA, F., TALAVERA, S., & GUERRA, M. Cytotaxonomy of diploid and
224 polyploid Aristolochia (Aristolochiaceae) species based on the distribution of
225 CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, v.
226 280(3-4), p. 2196227, 2009.
- 227 BRASILEIRO-VIDAL, A. C., DOS SANTOS-SEREJO, J. A., SOARES FILHO, W. D. S.,
228 & GUERRA, M. A simple chromosomal marker can reliably distinguish Poncirus
229 from Citrus species. **Genetica**, v. 129(3), p. 2736279, 2007.
- 230 BRASILEIRO-VIDAL, A. C., MELO-OLIVEIRA, M. B., CARVALHEIRA, G. M. G., &
231 GUERRA, M. Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and
232 related species. **Micron**, v. 40(8), p. 8516859, 2009.
- 233 CARVALHO, R., & GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and
234 eight related species. **Hereditas**, v. 136(2), p. 1596168, 2002.
- 235 CARVALHO, R. DE, GUERRA, M., & CARVALHO, P. C. L. DE. Occurrence of
236 Spontaneous Triploidy in *Manihot esculenta* Crantz. **CYTOLOGIA**, v. 64(2), p. 1376
237 140, 1999.
- 238 CARVALHO, R., SOARES FILHO, W. S., BRASILEIRO-VIDAL, A. C., & GUERRA, M.
239 The relationships among lemons, limes and citron: A chromosomal comparison.
240 **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109(1-3), p. 2766282, 2005.
- 241 CORNÉLIO, M. T. M. N., FIGUEIRÔA, A. R. S., SANTOS, K. G. B., CARVALHO, R.,

242 SOARES FILHO, W. S., & GUERRA, M. Chromosomal relationships among cultivars
243 of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. **Plant Systematics and**
244 **Evolution**, v. 240(1-4), p. 1496161, 2003.

245 DØHONT, A., ISON, D., ALIX, K., ROUX, C., & GLASZMANN, J. C. Determination of
246 basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal
247 RNA genes. **Genome**, v. 41(2), p. 2216225, 1998.

248

249 DUPUTIÉ, A., SALICK, J., & MCKEY, D. Evolutionary biogeography of *Manihot*
250 (*Euphorbiaceae*), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments.
251 **Journal of Biogeography**, v. 38(6), p. 103361043, 2011.

252 FERNANDES, T., DE ALMEIDA REGO, L. D. N. A., NARDY, M., YUYAMA, P. M., &
253 VANZELA, A. L. L. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (*Solanaceae*)
254 revealed by fluorescent chromosome banding and FISH. **Genetics and Molecular**
255 **Biology**, v. 32(2), p. 32067, 2009.

256 FREGONEZI, J. N., FERNANDES, T., TOREZAN, J. M. D., VIEIRA, A. O. S., &
257 VANZELA, A. L. L. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (*Solanaceae*)
258 based on the physical mapping of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v.
259 29(1), p. 976104, 2006.

260 GILL, K. S., & GILL, B. S. Mapping in the realm of polyploidy: The wheat model.
261 **BioEssays**, v. 16(11), p. 8416846, 1994.

262 GUERRA, M. Cytogenetics of *Rutaceae*. V. High chromosomal variability in *Citrus* species
263 revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v. 71(November 1992), p. 2346241, 1993.

264 GUERRA, M. **FISH - Conceitos e Aplicações na Citogenética**. (M. Guerra, Ed.). Ribeirão

- 265 Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2004.
- 266 GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: Concepts and implications.
267 **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120(3-4), p. 3396350, 2008.
- 268 GUERRA, M., & SOUZA, M. J. DE. **Como observar cromossomos : um guia de técnicas**
269 **em citogenética vegetal, animal, e humana.** (M. Guerra & M. J. de Souza, Eds.).
270 Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto. 2002.
- 271 KENTON, A., PAROKONNY, A. S., GLEBA, Y. Y., & BENNETT, M. D. Characterization
272 of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. **Mol Gen Genet**, v. 240,
273 p. 1596169, 1993.
- 274 LAS PEÑAS, M. L., URDAMPILLETA, J. D., BERNARDELLO, G., & FORNI-MARTINS,
275 E. R. Karyotypes, heterochromatin, and physical mapping of 18S-26S rDNA in
276 Cactaceae. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 124(1), p. 72680, 2009.
- 277 LEVAN, A, FREDGA, K., & SANDBERG, A. Nomenclature for centromeric position at
278 chromosomes. **Hereditas**, p. 2016220, 1964.
- 279 LYSAK, M. A, BERR, A., PECINKA, A., SCHMIDT, R., MCBREEN, K., & SCHUBERT,
280 I. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related
281 Brassicaceae species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**
282 **States of America**, v. 103(13), p. 522465229, 2006.
- 283 MAGOON, M. L., KRISHNAN, R., & VIJAYA BAI, K. Cytogenetics of the F1 hybrid
284 between cassava and ceara rubber, and its backcross. **Genetica**, v. 41(1), p. 4256436,
285 1970.
- 286 MARQUES, A., ROA, F., & GUERRA, M. Karyotype differentiation in three species of
287 *Tripogandra* Raf. (Commelinaceae) with different ploidy levels. **Genetics and**

- 288 **Molecular Biology**, v. 33(4), p. 7316738, 2010.
- 289 MOSCONE, E. A., KLEIN, F., LAMBROU, M., FUCHS, J., & SCHWEIZER, D.
290 Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes
291 in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). **Genome**, v. 42(6), p. 122461233,
292 1999.
- 293 NASSAR, J. M., HAMRICK, J. L., & FLEMING, T. H. Allozyme diversity and genetic
294 structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). **The Journal of Heredity**,
295 v. 93(3), p. 1936200, 2002.
- 296 NASSAR, N. M. A. Attempts to hybridize wild *Manihot* species with cassava. **Economic**
297 **Botany**, v. 34(1), p. 13615, 1980.
- 298 NASSAR, N. M. A. (2000). Cytogenetics and evolution of cassava (*Manihot esculenta*
299 Crantz). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23(4), p. 100361014, 2000.
- 300 PEDROSA, A., SCHWEIZER, D., & GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the
301 hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **TAG Theoretical and**
302 **Applied Genetics**, v. 100(3-4), p. 3616367, 2000.
- 303 PEDROSA-HARAND, A., DE ALMEIDA, C. C. S., MOSIOLEK, M., BLAIR, M. W.,
304 SCHWEIZER, D., & GUERRA, M. Extensive ribosomal DNA amplification during
305 Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. **Theoretical and Applied**
306 **Genetics**, v. 112(5), p. 9246933, 2006.
- 307 RAN, Y., HAMMETT, K. R. W., & MURRAY, B. G. Phylogenetic Analysis and Karyotype
308 Evolution in the Genus *Clivia*(Amaryllidaceae). **Annals of Botany**, v. 87, p. 8236830,
309 2001.
- 310 SARDOS, J., RODIER-GOUD, M., DAMBIER, D., MALAPA, R., NOYER, J. L., &

- 311 LEBOT, V. Evidence for spontaneous polyploidization in cassava *Manihot esculenta*
312 Crantz. **Plant Systematics and Evolution**, v. 283(3), p. 2036209, 2009.
- 313 SHE, C., LIU, J., DIAO, Y., HU, Z., & SONG, Y. The distribution of repetitive DNAs along
314 chromosomes in plants revealed by self-genomic in situ hybridization. *Journal of*
315 *Genetics and Genomics*, v. 34(5), p. 437648, 2007.
- 316 SOUZA, L. G. R., CROSA, O., & GUERRA, M. Karyological circumscription of *Ipheion*
317 *Rafinesque* (Gilliesioideae, Alliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 287(3), p.
318 1196127, 2010.
- 319 URDAMPILLETA, J. D., CHIARINI, F., STIEFKENS, L., & BERNARDELLO, G.
320 Chromosomal differentiation of Tribe Cestreae (Solanaceae) by analyses of 18-5.8-26S
321 and 5S rDNA distribution. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301(5), p. 132561334,
322 2015.
- 323 WANZENBÖCK, E.-M., SCHBFER, C., SCHWEIZER, D., & BACHMAIR, A. Ribosomal
324 transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and
325 do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant**
326 **Journal**, v. 11(5), p. 100761016, 1997.
- 327 WEISS-SCHNEEWEISS, H., TREMETSBERGER, K., SCHNEEWEISS, G. M., PARKER,
328 J. S., & STUESSY, T. F. Karyotype diversification and evolution in diploid and
329 polyploid South American *Hypochoeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization
330 and genetic fingerprint data. **Annals of Botany**, v. 101(7), p. 9096918, 2008.
- 331 YAMAMOTO, M., ABKENAR, A. A., MATSUMOTO, R., KUBO, T., & TOMINAGA, S.
332 CMA Staining Analysis of Chromosomes in Citrus Relatives , *Clymenia* , *Eremocitrus*
333 and *Microcitrus*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 77(1),
334 p. 24627, 2008

- 335 YAMAMOTO, M., ABKENAR, A. A., MATSUMOTO, R., NESUMI, H., YOSHIDA, T.,
336 KUNIGA, T., í TOMINAGA, S. CMA Banding Patterns of Chromosomes in Major
337 Citrus Species. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 76(1), p.
338 36640, 2007).

339 Tabelas

Tabela 1. Lista de espécies analisadas, origem e conjunto cromossômico somático.

Seção	Taxon		Origem	2n
	Espécie	Variedade/Cultivar		
<i>Manihot</i>	<i>Manihot eculenta</i> Crantz	Aipim Bravo	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		Cruvela	Recife - PE	36
		Isabel de Souza	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		Jaburu*	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		Macaxeira Peixe	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		Mandiocaba	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		Clone 83194	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		BGM 66	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		BGM 342	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		BGM 0537	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		BGM 0549	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		BGM 0867	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		BGM 1159	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		BGM 1444	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
<i>Sinuatae</i>	<i>Manihot anomala</i> Pohl		EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		<i>Manihot glaziovii</i> Müll. Arg	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
<i>Glaziovianae</i>	<i>Manihot glaziovii</i> subsp. <i>noronhense</i>		Areia - PB	36
		<i>Manihot dichotoma</i> Ule	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
<i>Peruvianae</i>	<i>Manihot maracasensis</i> Ule		EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		<i>Manihot leptophylla</i> Pax & K. Hoffmann	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
<i>Grandibracteatae</i>	<i>Manihot tomentosa</i> Pohl		EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
		<i>Manihot elongata</i> P. Carvalho & M. Martins	EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas - BA)	36
<i>Sem seção</i>	<i>Manihot reflexifolia</i> P. Carvalho & M. Martins		Chapada Diamantina - BA	36
		Híbrido de <i>M. reflexifolia</i>	Chapada Diamantina - BA	36

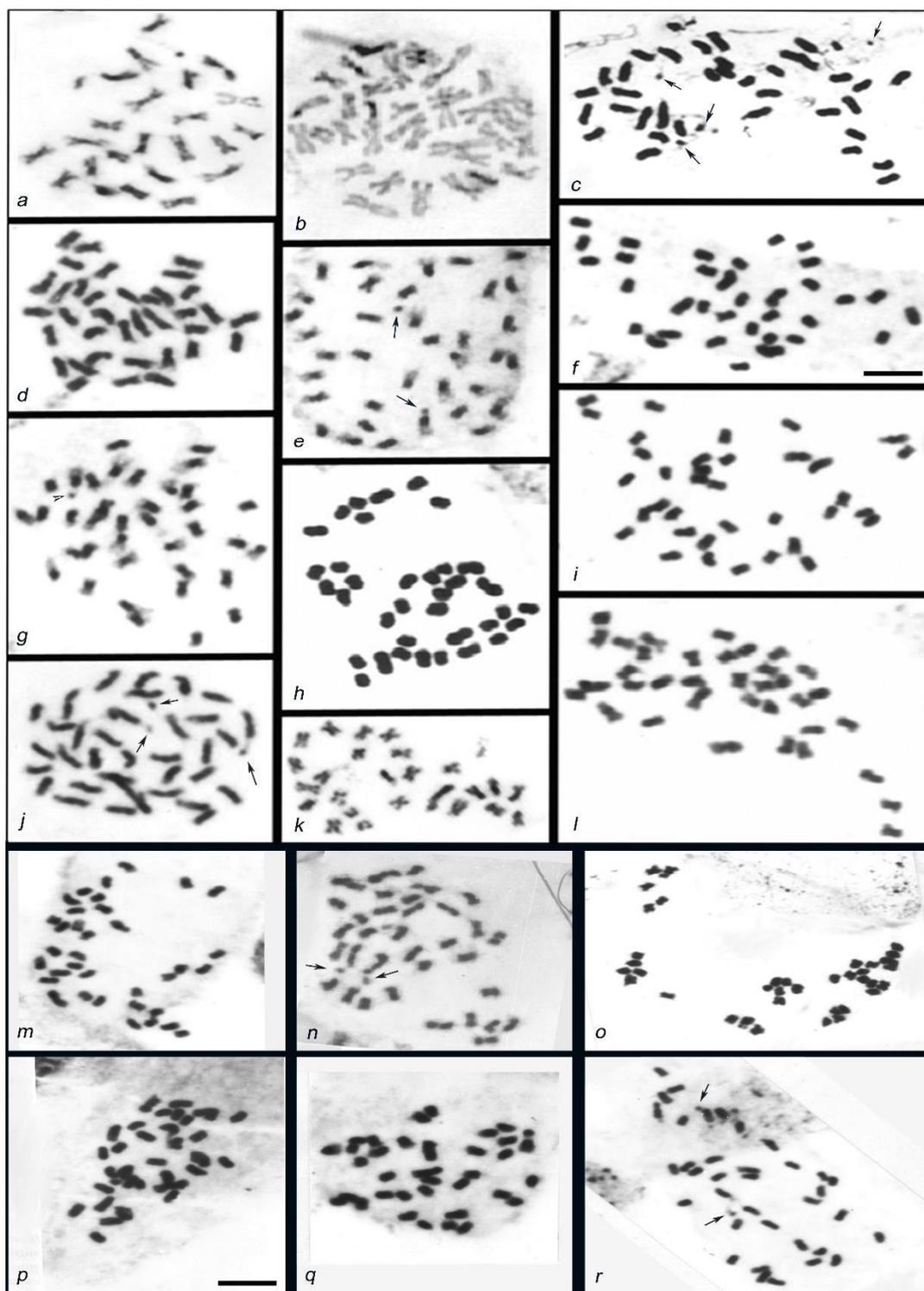
Tabela 2. Número cromossômico (2n); Média do Comprimento Cromossômico (CMC); Cromossomo menor e maior (b-B); Média da razão entre braço longo e curto (R) e do Índice Centromérico (IC); Fórmula Cariotípica Média (M: metacêntrico) de espécies do gênero *Manihot* Mill. Seções descritas de acordo com Rogers e Appan (1973).

* Cromossomos menos condensados.

Taxon		Variedade/ Cultivar	2n	CMC	b-B (µm)	R	IC	FMC
Seção	Espécie							
Manihotioides	<i>Manihot eculenta</i> Crantz	Aipim Bravo	36	0,960±0,041	0,669±0,005 ó 1,722±0,217	1,191	46,069	M
		BGM 66	36	1,034±0,035	0,725±0,004 ó 1,635±0,090	1,274	44,646	M
		BGM 1444	36	1,075	0,580±0,011 ó 1,989±0,985	1,293	44,127	M
		BGM 1159	36	0,948±0,024	0,679±0,009 ó 1,409±0,001	1,189	45,877	M
		Clone 83194	36	0,867±0,054	0,547±0,004 ó 1,680±0,154	1,260	44,804	M
		Cruvela	36	1,045±0,060	0,573 ó 1,764±0,100	1,366	43,108	M
		Jaburu*	36	2,622±0,298	1,591±0,111 ó 4,304±0,002	1,250	44,821	M
		Macaxeira Peixe	36	1,051±0,058	0,709±0,002 ó 1,918±0,161	1,447	42,198	M
Sinuatae	<i>Manihot anômala</i> Pohl	-	36	0,748±0,016	0,570±0,002 ó 1,140±0,026	1,351	43,173	M
Glaziovianne	<i>Manihot glaziovii</i> Müll. Arg	-	36	0,954±0,019	0,708±0,001 ó 1,325±0,002	1,350	43,411	M
Grandibracteatae	<i>Manihot tomentosa</i> Pohl	-	36	0,984±0,019	0,602±0,015 ó 1,661±0,306	1,432	41,967	M

341

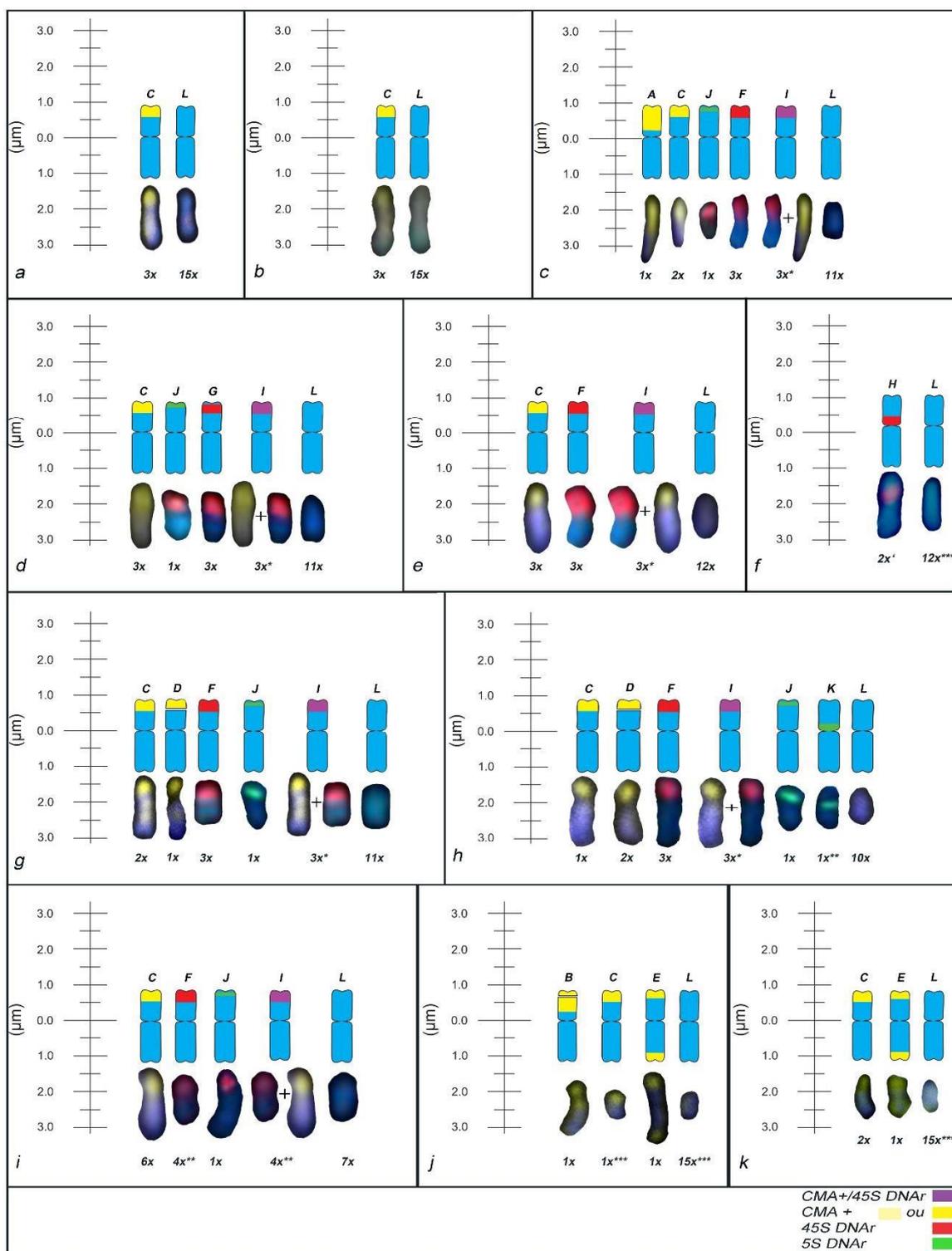
342



343

Figura 1. Complementos cromossômicos registrados via coloração convencional por Giemsa de cultivares de *Manihot esculenta* e espécies relacionadas. (a) *M. esculenta* BGM 0867; (b) *M. esculenta* BGM 342; (c) *M. glaziovii*; (d) *M. dichotoma*; (e) *M. peruviana*; (f) *M. anômala*; (g) *M. tomentosa*; (h) *M. esculenta* BGM 0537; (i) *M. irwinii*; (j) *M. esculenta* cv Isabel de Souza; (k) *M. esculenta* BGM 0549 (célula incompleta); (l) *M. esculenta* BGM 1159; (m) *M. esculenta* BGM 66; (n) *M. esculenta* BGM 1444; (o) *M. esculenta* Clone 83194; (p) *M. esculenta* cv. Cruvela; (q) *M. esculenta* cv. Jaburu; (r) *M. esculenta* cv. Macaxeira-peixe. Setas indicam satélites. Barras indicam 10 μ m.

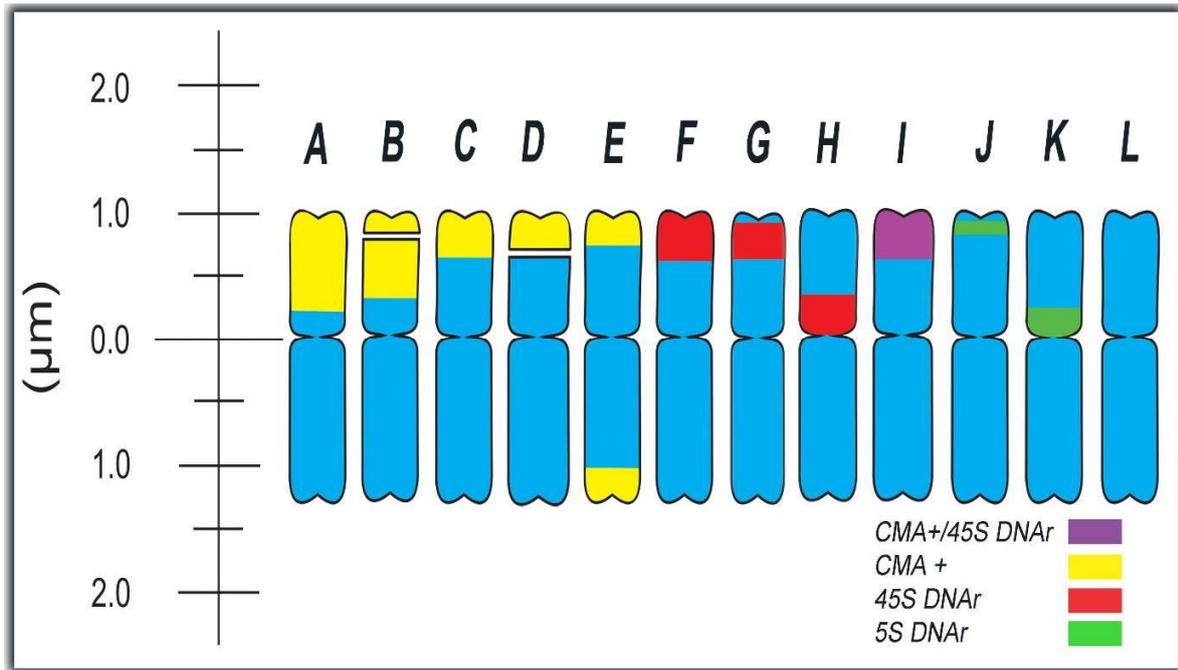
344



345

Figura 2. Representação esquemática, classificação e distribuição dos tipos cromossômicos de espécies do gênero *Manihot*. **(a)** *M. esculenta* BGM 1159; **(b)** *M. esculenta* cv. Cruvela; **(c)** *M. esculenta* cv. Mandiocaba; **(d)** *M. maracasensis*; **(e)** *M. elongata*; **(f)** *M. leptophylla*; **(g)** *M. glaziovii*; **(h)** *M. glaziovii* subsp. *noronhense*; **(i)** *M. dichotoma*; **(j)** Híbrido de *M. reflexifolia*; **(k)** *M. reflexifolia* (possível parental). * Quando hibridizado consecutivamente e/ou conjuntamente; **Sítio extra em heterozigose; ***Ocorrência variável; (↔) dois sítios 45S terminais. Letras em maiúsculo representam os tipos cromossômicos do gênero. **Ver figura 3.** Escala representa valores médios dos cromossomos

346



347

Figura 3. Nomenclatura de tipos cromossômicos encontrados em espécies do gênero *Manihot* com base no tamanho, número e posição dos sinais de bandeamento CMA/DAPI e hibridização in situ de sondas de DNAr 45S e 5S. Tipos: **A**= Banda CMA⁺ longa; **B**= Banda CMA⁺ longa + Satélite; **C**= Banda CMA⁺ terminal; **D**= Banda CMA⁺ terminal + Satélite; **E**= Banda CMA⁺ terminal em ambos os braços cromossômicos; **F**= DNAr 45S terminal; **G**= DNAr 45S subterminal; **H**= DNAr 45S pericentroméricas; **I**= Sobreposição dos tipos C e F; **J**= DNAr 5S subterminal; **K**= DNAr 5S pericentromérico; **L**= Sem marcações.

CAPÍTULO III

Diversidade cariotípica e de blocos CMA⁺ em espécies de *Bambusa* Scherb e *Dendrocalamus* Nees

Artigo a ser submetido à Revista African Journal of Biotechnology (1684-5315)

Não publicado a pedido do autor
conforme Termo de Publicação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de técnicas citogenéticas na avaliação de espécies vegetais para fins de investigação evolutiva, filogenética e taxonômica tem se mostrado bastante útil e eficiente.

Seu uso na caracterização de espécies, acessos e variedades agronômicas também tem contribuído significativamente na implementação de programas de melhoramento, baseado na investigação de características agronômicas que possam ser assistidas via manejo e observação dos cariótipos.

O desenvolvimento de ferramentas que auxiliem na identificação, caracterização e/ou diferenciação de espécies com base em caracteres citológicos tem sido cada vez mais explorado, sendo o índice de tipos cromossômicos proposto no presente trabalho uma delas.

Acreditamos serem relevantes as informações aqui tratadas para estudos mais aprimorados na cultura da Mandioca.

Entendemos ser a subfamília Bambusoideae diversificada quanto aos seus cariótipos, havendo variações intra e interspecífica no grupo.

Os diferentes níveis de ploidia encontrada em Bambusoideae aparentam mesmo terem surgido independentemente ao longo de sua evolução, destacando-se o nível hexaploide como o mais estável.

As diferenças nas marcações de bandeamento por fluorocromos CMA/DAPI evidenciam a variação ocorrente entre as espécies analisadas.

Acreditamos que os dados apresentados neste trabalho podem auxiliar na caracterização de espécies dos grupos analisados, bem como na contribuição para trabalhos futuros.

ANEXOS



CAPA SOBRE PÁGINA DO USUÁRIO PESQUISA ATUAL ANTERIORES
 NOTÍCIAS VIDEO INSTITUCIONAL

OPEN JOURNAL SYSTEMS

[Ajuda do sistema](#)

Capa > Sobre a revista > **Submissões**

Submissões

- [Submissões Online](#)
- [Diretrizes para Autores](#)
- [Política de Privacidade](#)

Submissões Online

Já possui um login/senha de acesso à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira?

[ACESSO](#)

Não tem login/senha?

[ACESSO A PÁGINA DE CADASTRO](#)

O cadastro no sistema e posterior acesso, por meio de login e senha, são obrigatórios para a submissão de trabalhos, bem como para acompanhar o processo editorial em curso.

Diretrizes para Autores

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério de relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em "comentários ao editor", informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 de submissão (Inclusão de metadados), em "resumo da biografia" de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em "incluir autor" para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

"Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado "....." e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer:

USUÁRIO

Logado como:

david-oliveiras

- [Perfil](#)
- [Sair do sistema](#)

IDIOMA

Selecione o idioma

Português (Brasil) ▼

Submeter

CONTEÚDO DA REVISTA

Pesquisa

Escopo da Busca

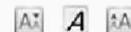
Todos ▼

Pesquisar

Procurar

- [Por Edição](#)
- [Por Autor](#)
- [Por título](#)

TAMANHO DE FONTE



INFORMAÇÕES

- [Para leitores](#)
- [Para Autores](#)
- [Para Bibliotecários](#)

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o e-mail e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".

- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.

- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.

- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.

- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

- Não devem conter palavras que componham o título.

- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#).

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.

- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão **Material e Métodos** deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos **Material e Métodos** devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.

- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes superfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão **Resultados e Discussão** deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo **Conclusões** deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra **Agradecimentos** deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra **Referências** deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre

Bradyrhizobium japonicum, B. elkanii e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campinas Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

- Redação das citações fora de parênteses

- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.

- Devem ser auto-explicativas.

- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.

- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia na tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar

Parágrafo.

- Notas de rodapé das tabelas

- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

- Só **devem** acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra **Figura**, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

- Devem ser auto-explicativas.

- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.

- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).

- Não usar negrito nas figuras.

- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- Resumo com 100 palavras, no máximo.

- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.

- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.

- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.

- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.

- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.

- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: sct.pab@embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados e seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito deve ser inédito e não pode ter sido submetido, simultaneamente, a outro periódico, e seus dados (tabelas e figuras) não podem ter sido publicados parcial ou totalmente em outros meios de publicação técnicos ou científicos (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas, etc.).
2. O texto deve ser submetido no formato do Microsoft Word, em espaço duplo, escrito na fonte Times New Roman 12, tamanho de papel A4, com páginas e linhas numeradas; e o arquivo não deve ultrapassar o tamanho de 20 MB.
3. O artigo deve ter, no máximo, 20 páginas e tem que estar organizado na seguinte ordem: Título; nome completo dos autores, seguido de endereço institucional e eletrônico; Resumo; Termos para indexação; Title, Abstract; Index terms; Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Referências; tabelas e figuras.
4. Os padrões de texto e de referências bibliográficas devem ser apresentados de acordo com as orientações, para a apresentação de manuscritos, estabelecidas nas Diretrizes aos autores, as quais se encontram na página web da revista PAB.
5. Mensagens de concordância dos coautores com o conteúdo do manuscrito e sua submissão à revista devem ser compiladas pelo autor correspondente em um arquivo do Microsoft Word e carregadas no sistema como um documento suplementar, no quarto passo do processo de submissão.
6. Diante do grande número de trabalhos recebidos para publicação (média de 110 por mês), solicitamos sua concordância com os seguintes procedimentos adotados pela revista PAB:

Os trabalhos são analisados pela Comissão Editorial, antes de serem submetidos à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se os seguintes aspectos, entre outros: escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura; resultados com contribuição significativa; qualidade das tabelas e figuras; e, finalmente, originalidade e consistência das conclusões.

Após a aplicação desses critérios, caso o número de trabalhos aprovados ultrapasse a capacidade de publicação mensal, é aplicado o critério da **relevância relativa**. Segundo esse critério, os trabalhos com contribuição mais significativa para o avanço do conhecimento científico são aprovados. Esse critério é aplicado apenas aos trabalhos que atendam aos requisitos de qualidade, mas que, por excederem a capacidade de publicação mensal da revista, não podem ser todos aprovados. Por esse mesmo motivo, informamos que não aceitamos pedido de reconsideração.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (final) Caixa Postal 040315 - Brasília, DF - Brasil - 70770-901

Fone: +55 (61) 3448-4231 / 3448-4162 - Fax: (61) 3272-4168

AJB - Instructions for Authors

Introduction

Research ethics

Reporting guidelines

Preparing your manuscript

Title

Abstract

Abbreviations

The Introduction

Materials and methods

Results and discussion

Declaration of conflict of interest

Acknowledgments

References

Tables and figures

Acceptance Certificate

Payment of manuscript handling fee

Proofs

Publication

Publication Notification

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Research Ethics

Studies involving human subjects should be conducted according to the World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

Studies involving non human animals should follow appropriate ethical guidelines such as the Animal Welfare Act, The Animals (Scientific Procedures) Act (Amendment) Order 1993, The EU parliament directive on the protection of animals used for scientific purposes, ARRPs policies and guidelines, etc.

Reporting guideline

Responsible reporting of research studies, which includes a complete, transparent, accurate and timely account of what was done and what was found during a research study, is an integral part of good research and publication practice and not an optional extra.

See additional guidelines for reporting of health research.

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the IMRAD structure.

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name, middle-name, and last-name).

Affiliations of authors (department and institution).

Emails and phone numbers

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in unstructured or structured format. The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion maybe combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a table should be stated.

Tables should be numbered consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or Excel spreadsheet.

Figures/Graphics should be prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Examples:

Baumert J, Kunter M, Blum W, Brunner M, Voss T, Jordan A, Klusmann U, Krauss S, Neubrand M, Tsai YM (2010). Teachers' mathematical knowledge, cognitive activation in the classroom, and student progress. *Am. Educ. Res. J.* 47(1):133-180.

<http://dx.doi.org/10.3102/0002831209345157>

Christopoulous DK, Tsionas EG (2004). "Finacial Development and Economic Growth: Evidence from Panel Unit Root and Cointegration Tests" *J. Dev.Econ.* pp.55-74

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdevco.2003.03.002>

Goren A, Laufer J, Yativ N, Kuint J, Ben Ackon M, Rubinshtein M, Paret G, Augarten A (2001). Transillumination of the palm for venipuncture in infants. *Pediatric. Emerg. Care* 17:130-131.

<http://dx.doi.org/10.1097/00006565-200104000-00013> PMID:11334094

Mishra A, Mishra SC (2001). Cost-effective diagnostic nasal endoscopy with modified otoscope. *J. Laryngol. Otol.* 115:648-649.

<http://dx.doi.org/10.1258/0022215011908739> PMID:11535147

Acceptance Certificate

Authors are issued an Acceptance Certificate for manuscripts that have been reviewed and accepted for publication by an editor.

Payment of manuscript handling fee

Once a manuscript has been accepted, the corresponding author will be contacted to make the necessary payment of the manuscript handling fee. Kindly note that on the manuscript management system, the payment option is only enabled for manuscripts that have been accepted for publication.

Proofs

Prior to publication, a proof is sent to the corresponding author. Authors are advised to read the proof and correct minor typographical or grammatical errors. Authors should promptly return proofs to the editorial office.

Publication

Once proofs are received at the editorial office, the manuscripts are usually included in the next issue of the journal. The article will thereafter be published on the journal's website

Publication Notification

After the article is made available on the journal's website, a publication notice is sent to the corresponding author with links to the issue and article.

We welcome manuscripts edited by the following organizations:

JOURNALS CONSORTIUM (www.journalsconsortium.org)

EDITAGE (www.editage.com)

BIOEDIT (www.bioedit.co.uk)

NARVAN (www.banarvan.com)