



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA  
MESTRADO EM FITOTECNIA

MARIA DE FÁTIMA DUARTE DE SOUZA NETA

**SIMILARIDADE GENÉTICA DE *Manihot esculenta* Crantz E DE *Fusarium* spp.  
ISOLADOS DE PLANTIOS COMERCIAIS DE MANDIOCA NO ESTADO DO RIO  
GRANDE DO NORTE, BRASIL**

MOSSORÓ

2024

MARIA DE FÁTIMA DUARTE DE SOUZA NETA

**SIMILARIDADE GENÉTICA DE *Manihot esculenta* Crantz E DE *Fusarium* spp.  
ISOLADOS DE PLANTIOS COMERCIAIS DE MANDIOCA NO ESTADO DO RIO  
GRANDE DO NORTE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ioná Santos Araújo Holanda.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio

MOSSORÓ

2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

DN469 Duarte de Souza Neta, Maria de Fátima.  
s Similaridade Genética de *Manihot esculenta*  
Crantz e de *Fusarium* spp. isolados de plantios  
comerciais de mandioca no Estado do Rio Grande do  
Norte, Brasil. / Maria de Fátima Duarte de Souza  
Neta. - 2024.  
58 f. : il.

Orientadora: IONÁ SANTOS ARAÚJO HOLANDA.  
Coorientadora: MÁRCIA MICHELLE DE QUEIROZ  
AMBRÓSIO.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Fitotecnia, 2024.

1. Etnovarietades. 2. Similaridade. 3.  
Fitopatogeno. I. SANTOS ARAÚJO HOLANDA, IONÁ ,  
orient. II. DE QUEIROZ AMBRÓSIO, MÁRCIA MICHELLE,  
co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade  
com AACR2 e os dados fornecidos pelo) autor(a).  
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência  
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva  
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 417**

**Matricula do aluno: 2022100712. Página 1 de 1**

Aos vinte e dois dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, no(a) Google Meet, sob a presidência do(a) professor(a) Dr<sup>a</sup>. Ioná Santos Araújo Holanda, reuniu-se a banca examinadora de defesa de dissertação de **mestrado** de autoria de **Maria de Fátima Duarte de Souza Neta**, aluno(a) do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, com o título: **SIMILARIDADE GENÉTICA DE *Manihot esculenta* Crantz E DE *Fusarium spp.* ISOLADOS DE PLANTIOS COMERCIAIS DE MANDIOCA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**. A banca examinadora ficou assim constituída: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ioná Santos Araújo Holanda, presidente da banca e orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Mitsa Paiva Negreiros (externo ao Programa), Dr. Leonardo Luiz Calado (externo à instituição), Dr. Jorge Alves da Silva Neto (pesquisador), como examinadores. Após declarada aberta a sessão, o(a) senhor presidente passou a palavra ao(à) mestrando(a) para a exposição e, a seguir, aos examinadores para as devidas análises, que se desenvolvem nos termos regimentais. Não foram registradas ocorrências. Concluída a defesa, foram realizadas as arguições e as sugestões feitas foram acatadas. Em seguida, procedeu-se ao julgamento do trabalho pelos membros da banca examinadora, que consideraram a dissertação **APROVADA**. O(a) discente tem a ciência de que fará jus ao título de mestre somente após a entrega definitiva da dissertação, com as correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, em um prazo máximo de 90 (noventa) dias. E, para constar, eu, *José da Silva*, presidente da banca examinadora, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme, foi assinada por mim e demais membros da banca examinadora.

Mossoró-RN, 22 de fevereiro de 2024.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ioná Santos Araújo Holanda

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Mitsa Paiva Negreiros – UFERSA

---

Dr. Jorge Alves da Silva Neto (pesquisador)

---

Dr. Leonardo Luiz Calado - INSA

---

Maria de Fátima Duarte de Souza Neta (discente)

MARIA DE FÁTIMA DUARTE DE SOUZA NETA

**SIMILARIDADE GENÉTICA DE *Manihot esculenta* Crantz E DE *Fusarium* spp.  
ISOLADOS DE PLANTIOS COMERCIAIS DE MANDIOCA NO ESTADO DO RIO  
GRANDE DO NORTE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Defendida em: 22 / 02 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Ioná Santos Araújo Holanda, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> (UFERSA)  
Presidente

---

Jorge Alves da Silva Neto, Prof. Dr. (UFERSA)  
Membro Examinador

---

Andréia Mitsa Paiva Negreiros, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. (UFERSA)  
Membro Examinadora

---

Leonardo Luiz Calado, Prof. Dr. (INSA)  
Membro Examinador

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela permissão de cursar o Mestrado, por prover, sustentar e ter me dado sabedoria e resiliência para concluir essa etapa tão importante da minha vida profissional;

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) pela oportunidade de formação acadêmica;

Ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia e seu núcleo de professores pela contribuição para a minha formação profissional;

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da minha pesquisa e bolsa de estudo;

Ao pessoal da Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA) por ter cedido o material vegetal para o experimento e por toda assistência nas coletas.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Ioná Santos Araújo Holanda, por me acolher em sua equipe, por acreditar no meu trabalho, por me ouvir e por ser esse ser humano incrível, por ser fonte de inspiração e por todo tempo dedicado para que eu pudesse me tornar Mestre;

Agradeço aos meus amigos que fazem o Laboratório de Biotecnologia Vegetal, amizade que construí durante esses dois anos. Sou grata por toda parceria e companheirismo;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Michelle e ao Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, pela orientação e parceria.

Aos meus pais Roberto César Pereira e Cícera Alteniza, por não medir esforços para que eu chegasse até aqui, por me apoiar nos dias difíceis, com palavras de alento e por acreditar fielmente no meu potencial;

Às minhas irmãs Maria Isabele e Maria Heloísa, por serem a minha motivação para trilhar esse caminho e conseguir dar exemplo como irmã mais velha;

À minha família, avós, tios e primos, pelo zelo e total admiração;

Agradeço aos amigos que conquistei no programa de Fitotecnia, com eles partilhei momentos de angústia, mas também bons momentos que ficarão eternizados, momentos de aprendizado e troca de experiência;

Agradeço as pessoas que trilharam o meu caminho durante esses dois anos morando em Mossoró, e que permanecem comigo até hoje, sendo apoio, sendo família, sendo lar para mim, são amigos que levarei no meu coração;

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué; 1.9

## RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) possui importância econômica e alimentar para as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Essa cultura apresenta uma diversidade genética que permite seu cultivo em áreas com características distintas, indicando adaptabilidade a condições bióticas e abióticas particulares de cada região. Apesar da mandioca ter aspectos relevantes, ela está exposta a doenças causadas por fungos fitopatogênicos, dentre eles, o *Fusarium* spp., que acomete a cultura e é um problema frequente, causando doenças de alto impacto econômico e social, resultando em queda progressiva na produção e inviabilizando áreas de plantio. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo: realizar a caracterização molecular de acessos de *Manihot esculenta* Crantz e isolados de *Fusarium* spp. através de marcadores de DNA ISSR. Para a análise da mandioca, foram coletadas folhas de 63 acessos e o DNA foi extraído pelo método CTAB. As amplificações foram realizadas via PCR utilizando 23 *primers* ISSR. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA utilizando o programa NTSYS-pc. Para as análises com *Fusarium* spp. foram coletados nove isolados presentes em seis variedades de mandioca e três de macaxeira sintomáticas. Os isolados fúngicos tiveram seus DNAs extraídos e depois amplificados via PCR, utilizando 24 *primers* ISSR. Para a construção do dendrograma, utilizou-se o método UPGMA. As amplificações com os DNAs de mandioca amplificaram 222 fragmentos, onde aproximadamente 90% foram compostos de bandas polimórficas com uma média de 9,65 fragmentos por primer. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) apresentou uma média de 0,24. A análise do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) apresentou um valor de 0,72317. A partir da análise pelo método de agrupamento foi construído um dendrograma, que permitiu a formação de seis grupos heteróticos. Os grupos I, II, III e V, apresentaram etnovariedades únicas em termo de perfil genético, e IV e VI foram compostos por um maior número de acessos. Porém, dentro do grupo VI estão os dois acessos de mandioca brava (MBTO46 e MBTO47), que apresentaram maior valor de similaridade genética. Na caracterização molecular com os isolados de *Fusarium* spp, foram gerados 199 fragmentos, sendo 99% compostos de bandas polimórficas. O primer UBC-808 foi o único que apresentou um loco monomórfico dos 11 gerados, sendo 90,91% de polimorfismo. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) de cada primer variou entre 0,20 (UBC-847) a 0,39 (UBC-812). No dendrograma formaram-se três grupos. O grupo I foi composto pelo isolado 06sr, o grupo II foi formado por sete isolados, 30ap, 18ap, 10ap, 11ap, 08sr e 7ap, e o grupo III composto pelo isolado 06ap. Pode-se perceber que o isolado 06sr apresentou maior distância genética, quando comparado aos demais isolados, com uma média baixa de similaridade, em torno de 0,1630, justificando assim, o fato do mesmo apresentar morfologicamente, uma coloração diferente dos outros isolados. Por meio dos resultados apresentados, os *primers* ISSR demonstraram eficácia na detecção de polimorfismos, evidenciando a presença de diversidade genética entre os indivíduos de *Manihot esculenta* e também de *Fusarium* spp.

**Palavras-chave:** Etnovariedades, Similaridade, Fitopatógeno.

## ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) has economic and food importance for tropical and subtropical regions of the world. This crop presents a genetic diversity that allows it to be cultivated in areas with different characteristics, providing adaptability to the particular biotic and abiotic conditions of each region. Although cassava has relevant aspects, it is exposed to diseases caused by phytopathogenic fungi, including *Fusarium* spp., which affects the crop and is a frequent problem, causing diseases with high economic and social impact, resulting in a progressive drop in production. and making planting areas unviable. In view of the above, this work aimed to: carry out the molecular characterization of accessions of *Manihot esculenta* Crantz and isolates of *Fusarium* spp. through ISSR DNA markers. For cassava analysis, leaves were collected from 63 accessions and DNA was extracted using the CTAB method. Amplifications were performed via PCR using 23 ISSR *primers*. Cluster analysis was performed by the UPGMA method using the NTSYS-pc program. For analyzes with *Fusarium* spp. new isolates were found present in six symptomatic cassava and three cassava varieties. The fungal isolates had their DNA extracted and then amplified via PCR, using 24 ISSR *primers*. To construct the dendrogram, the UPGMA method was used. Amplifications with cassava DNA amplified 222 fragments, of which approximately 90% were composed of polymorphic bands with an average of 9.65 fragments per primer. Polymorphic Information Content (PIC) received an average of 0.24. The analysis of the Cophenetic Correlation Coefficient (CCC) presented a value of 0.72317. From the analysis of the clustering method, a dendrogram was constructed, which allowed the formation of six heterotic groups. Groups I, II, III and V presented unique ethnovarieties in terms of genetic profile, and IV and VI were composed of a greater number of accessions. However, within group VI are the two wild cassava accessions (MBTO46 and MBTO47), which showed the highest genetic similarity value. In the molecular characterization with *Fusarium* spp isolates, 199 fragments were generated, 99% of which were composed of polymorphic bands. The UBC-808 primer was the only one that presented a monomorphic locus of the 11 generated, with 90.91% polymorphism. The Polymorphic Information Content (PIC) of each booklet varied between 0.20 (UBC-847) and 0.39 (UBC-812). Three groups were formed in the dendrogram. Group I was made up of isolate 06sr, group II was made up of seven isolates, 30ap, 18ap, 10ap, 11ap, 08sr and 7ap, and group III was made up of isolate 06ap. It can be seen that isolate 06sr presented greater genetic distance, when compared to the other isolates, with a low average similarity, around 0.1630, thus justifying the fact that it morphologically presents a different color than the other isolates. Through the results presented, the ISSR *primers* demonstrated effectiveness in detecting polymorphisms, highlighting the presence of genetic diversity among individuals of *Manihot esculenta* and also *Fusarium* spp.

**Keywords:** Ethnovarieties, Similarity, Phytopathogen.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1** – Localização geográfica da origem dos acessos de mandioca brava e macaxeira, coletadas no Campo Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN) .....18

**Figura 2** – Gel de agarose 2% demonstrando os produtos da amplificação da PCR com o marcador TriTCC3'RC. M. Marcador 100 pb (DNA Ladder Plus) .....24

**Figura 3** – Dendrograma obtido pelo método UPGMA e complemento aritmético do índice de Jaccard como média de similaridade, em 63 etnovariedades de mandioca com base em 23 *primers* ISSR. Ponto de corte = 0,55% .....28

### CAPÍTULO II

**Figura 1** – Coloração do verso e reverso do micélio aéreo dos nove isolados de *Fusarium* spp. em meio BDA após 14 dias de incubação. Isolados: 1A/1a: 06ap; 1B/1b: 06sr; 1C/1c: 07sr; 1D/1d: 08ap; 1E/1e: 08sr; 1F/1f: 10ap; 1G/1g: 11ap; 1H/1h: 18ap; 1I/1i: 30ap.....45

**Figura 2** – Formação de estruturas de *Fusarium* spp. (3A) microconídios e (3B) macroconídios .....46

**Figura 3** – Clamidósporos jovens e crescimento da hifa do clamidósporo (4A) e a clamidósporos (4B) .....47

**Figura 4** – Padrão de amplificação dos DNAs dos nove isolados de *Fusarium* spp. com o *primer* ISSR UBC-825 em gel de agarose a 2%. DNAs (06ap, 06sr, 07sr, 08ap, 08sr, 10ap, 11ap, 18ap e 30ap). M: Marcador de peso molecular 100 pb (DNA Ladder Plus).....47

**Figura 5** – Dendrograma obtido pelo método UPGMA e complemento aritmético do índice de Jaccard como média de similaridade, entre os isolados de *Fusarium* spp., com base em 24 *primers* ISSR. Ponto de corte = 0,33% .....49

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1** – Etnovarietades de macaxeira coletadas no Campo Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária, no município de Apodi, Rio Grande do Norte, Brasil .....20

**Tabela 2** – Etnovarietades de mandioca brava coletadas no Campo Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária, no município de Apodi, Rio Grande do Norte, Brasil .....21

**Tabela 3** – *Primers* ISSR utilizados para a caracterização molecular nas 63 etnovarietades de mandioca coletadas no município de Apodi, Rio Grande do Norte, Brasil .....22

**Tabela 4** – *Primers* ISSR utilizados, número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP), porcentagem de polimorfismo (%P), índice de conteúdo polimórfico (PIC), relação múltipla efetiva (EMR) e índice do marcador (MI) .....24

**Tabela 5** – Similaridade genética entre os cinco principais pares de etnovarietades com maio e suas respectivas, distâncias genéticas .....26

**Tabela 6** – Média dos índices de diversidade genética calculadas pelo programa GenAIEX para 23 *primers* ISSR em cultivares de mandioca brava e macaxeira .....27

### CAPÍTULO II

**Tabela 1** – Isolados monospóricos de *Fusarium* spp. coletados em plantas de mandioca brava e macaxeira em municípios do Rio Grande Norte para estudos de diversidade genética .....40

**Tabela 2** – Sequência de *primers* ISSR e temperatura de anelamento utilizados para a caracterização molecular dos nove isolados de *Fusarium* spp .....42

**Tabela 3** – *Primers* ISSR utilizados, número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP), porcentagem de polimorfismo (%P), índice de conteúdo polimórfico (PIC), relação múltipla efetiva (EMR) e índice do marcador (MI) .....48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Water Agar
AMOVA	Analysis of molecular variance
BDA	Batata-Dextrose-Agar
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CIA	Chloroform-isoamyl alcohol
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMPARN	Agricultural Research Company
EMR	Effective multiple relationship
He	Expected heterozygosity
I	Shannon index
IAC	Agronomic Institute of Campinas
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
MI	Marker index
Na	Number of different alleles
Ne	Effective number of alleles
NF	Total number of amplified fragments
NFP	Number of polymorphic fragments
NPL	Number of polymorphic bands
NTSYS-pc	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
P%	Percentage of polymorphism
PCR	Reaction Chain Polymerase
PIC	Polymorphism information content
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBE	Tris Borate Edta
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages
UV	Ultraviolet

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO I: DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Manihot esculenta</i> Crantz UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ISSR</b> .....	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>18</b>
2.1 Local de coleta .....	18
2.2 Coleta do material botânico .....	18
2.3 Extração de DNA .....	21
2.4 Seleção de <i>primers</i> ISSR e reação de amplificação .....	22
2.5 Análise Estatística .....	23
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO II: SIMILARIDADE GENÉTICA DE <i>Fusarium</i> spp. ISOLADOS DE PLANTIOS COMERCIAIS DE MANDIOCA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL</b> .....	<b>37</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>40</b>
2.1 Coleta do material fúngico .....	40
2.2 Isolamento do fungo.....	40
2.3 Caracterização morfológica .....	41
2.4 Caracterização molecular .....	41
2.4.1 Extração de DNA .....	42
2.4.2 Seleção de <i>primers</i> ISSR e reação de amplificação via PCR .....	42
2.5 Análise Estatística .....	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
4.1 Caracterização morfológica dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. ....	45
4.2 Caracterização molecular dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	47
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta originária da América do Sul, conhecida como mandioca de mesa, macaxeira ou aipim. Seu cultivo é predominante em regiões tropicais e subtropicais, sendo que as raízes tuberosas representam o principal produto obtido a partir dessa cultura (SILVEIRA et al., 2021). É considerada uma das principais culturas agrícolas do mundo, destacando-se por sua importância econômica e pela capacidade de tolerar condições adversas, tais como baixa pluviosidade, solos ácidos e com baixa fertilidade. Sua relevância é notável em áreas onde as práticas agrícolas têm baixo índice tecnológico (DARYANTO et al., 2016).

Por ser uma espécie diversificada, representa um incontestável reservatório genético para o mundo. Sua relevância se estende como um valioso objeto de pesquisa, fonte de recursos genéticos e estudo das condições ecológicas, devido à sua ampla cultivoação por diversas populações (SIVIERO, 2020). Diante disso, há a necessidade de caracterização de bancos de germoplasma dessa espécie.

A caracterização do germoplasma é uma abordagem que visa documentar as características hereditárias de uma planta, possibilitando a identificação e a segregação genética dos acessos, portanto propiciando ganho na produção, promovendo melhorias na avaliação de estresses e desenvolvimento de pesquisas (AZEVEDO, 2010; ZUFFO et al. 2019).

Para caracterizar germoplasma, além de avaliar as características morfológicas, faz-se necessário escolher técnicas mais avançadas para garantir a qualidade da pesquisa, entre elas, existe a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que faz uso de marcadores moleculares, e tem como objetivo revelar polimorfismo nas sequências de DNA. Estes marcadores são bastante utilizados pois geram resultados que promovem grande avanço na genética molecular (TURCHETTO-ZOLET, 2017; NASCIMENTO, 2020).

Além da análise da variabilidade genética por meio de marcadores moleculares ISSR, faz-se necessário um estudo focado em fungos que afetam a cultura da mandioca. Isso se justifica pela composição favorável ao desenvolvimento de fungos e toxinas na espécie, decorrente da baixa quantidade de proteínas e alta quantidade de carboidratos. Esses desenvolvimentos de microrganismos, como os fungos, estão intimamente ligados a práticas inadequadas no campo, transporte e armazenamento, afetando a produtividade da mandioca. (ONO et al., 2021).

Dentre as doenças que acometem a cultura da mandioca, a podridão radicular causada por *Fusarium* spp. é um problema frequente, por se tratar de uma doença de alto impacto econômico e social no Brasil, causando queda progressiva na produção e inviabilizando áreas de plantio (STEFANELLO et al., 2017).

Durante um longo período, a identificação de *Fusarium* spp. dependia exclusivamente de critérios morfológicos, resultando frequentemente em conclusões conflituosas devido à limitação do número de características morfológicas em comparação com a diversidade genética extensa de espécies dentro do gênero. Portanto, a adoção de técnicas moleculares emergiu como uma ferramenta mais precisa para a identificação das espécies (BRUNS et al., 1990; O'DONNELL, 1997; SUMMERELL et al., 2010).

Devido às limitações encontradas em estudos tanto morfológicos quanto moleculares, utiliza-se as duas abordagens para a caracterização e identificação de *Fusarium*. Essa abordagem abrange informações biológicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares, proporcionando uma análise mais abrangente e confiável (BROWN; PROCTOR; 2013).

Portanto, a caracterização molecular dessa cultura permite uma compreensão mais aprofundada da diversidade genética presente nas variedades, o que é crucial para o desenvolvimento de variedades resistentes à pragas, doenças e condições ambientais adversas. Esse estudo serve para a seleção e melhoramentos genético, contribuindo para a preservação da diversidade genética existente. Além disso, a caracterização morfológica e molecular de fungos associados a plantas, desempenham um papel central na gestão eficiente da sanidade e produtividade das culturas. A capacidade de identificar de maneira precisa e específica os fungos patogênicos é crucial para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de doenças que podem afetar plantações. Além disso, esse conhecimento contribui para a conservação de culturas, auxiliando na preservação da biodiversidade agrícola e na sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Em suma, a caracterização desses fungos desempenha um papel crucial no fortalecimento da agricultura e na mitigação de impactos negativos nas plantações.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo: realizar a caracterização molecular de acessos de *Manihot esculenta* Crantz e de *Fusarium* spp. através de marcadores de DNA ISSR.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, Vânia Cristina Rennó. Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Molecular. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília – DF, 2010;
- BRUNS, T. D.; FOGEL, R.; TAYLOR, J. W. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. **Mycologia**, n. 2 v. 82, p. 175-184, 1990.
- DARYANTO, S. et al. Drought effects on root and tuber production: A meta-analysis. **Agricultura Water Management**, v. 176, p. 122-131, 2016
- NASCIMENTO et al. Identificação e caracterização morfológica de variedades de mandioca na Comunidade São João do Araçá. Itacoatiara, AM. **Anais da XVI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**, 2020.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.
- ONO et al. Fungi and mycotoxins in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its products. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, e2020240, 2021.
- SILVEIRA et al. Quality of table cassava roots fertilized with phosphorus. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 34, n.4, p. 965-975, 2021.
- SIVIERO et al. Agrobiodiversidade de Mandioca do Acre. **EMBRAPA**. Cap. 15, p. 224-237, 2020.
- STEFANELLO et al. Manejo da podridão radicular da mandioca pela combinação de manejo de solo, variedade resistente e controle biológico com *Trichoderma harzianum*. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v.13, n° 1, p. 31-45, 2017.
- SUMMERELL B. A. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 44, n. 1, p. 3-13, 2010.
- TURCHETTO-ZOLET et al. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, 2017.
- ZUFFO et al. Ciência em Foco. **Pantanal Editora**, cap. 2, Nova Xavantina – MT, 2019;

## CAPÍTULO I

### DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Manihot esculenta* Crantz UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ISSR

#### RESUMO

O estudo da diversidade genética de espécies vegetais tal como a *Manihot esculenta* Crantz proporciona uma base essencial para otimizar a preservação do germoplasma, além de promover avanços significativos associados às características de interesse agrônomo. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular de etnovarietades de *M. esculenta*, por meio de marcadores de DNA ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Foram coletadas amostras de folhas de 63 acessos e o DNA foi extraído pelo método CTAB. As amplificações foram realizadas via PCR utilizando-se 23 primers ISSR. A análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA utilizando o programa NTSYS-pc. Como resultado foram amplificados 222 fragmentos, onde aproximadamente 90% destes foram compostos de bandas polimórficas com uma média de 9,65 fragmentos por primer. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) apresentou uma média de 0,24. A análise do Coeficiente de Correlação Cofenética apresentou um valor de 0,72317. A partir da análise pelo método de agrupamento foi construído um dendrograma que formou seis grupos heteróticos. Os grupos formados apresentaram comportamentos distintos, os grupos I, II, III e V, apresentaram etnovarietades únicas em termo de perfil genético, e os grupos IV e VI foram compostos por maior número de acessos. Os *primers* ISSR demonstraram eficácia na detecção de polimorfismos, evidenciando a presença de diversidade genética entre os indivíduos de *M. esculenta*. Esses resultados destacam a complexidade da diversidade genética de mandioca brava e macaxeira estudadas, ressaltando a influência de fatores geográficos, históricos e sociais na estrutura genética dessas plantas.

**Palavras-chave:** Mandioca. Recursos genéticos. Polimorfismo.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Manihot esculenta* Crantz é uma planta originária da América do Sul comumente conhecida como mandioca de mesa, macaxeira ou aipim. Pertence ao filo *Magnoliophyta*, classe *Magnolipsida*, ordem *Malpighiales*, família *Euphorbiaceae*, gênero *Manihot* (GONÇALVES, 2021). Seu cultivo predomina em regiões tropicais e subtropicais, tendo como produto principal as raízes tuberosas (SILVEIRA et al., 2021), que podem ser classificadas como mandioca de “mesa”, mansa ou brava, assim como pelo teor de ácido cianídrico (PINTO, 2017). Vale ressaltar que concentrações elevadas de ácido cianídrico impossibilitam o consumo humano da raiz tuberosa (ZUFFO et al., 2019).

Existem 100 espécies de mandioca, mas apenas a *Manihot esculenta* Crantz é comercializada tanto como mandioca de mesa como para a indústria (SILVA et al., 2021). Essa cultura tem relevância para dieta alimentar por apresentar alto teor energético, e ser economicamente acessível. Com isso, constitui-se em um bom objeto de pesquisas, recursos genéticos e condições ecológicas por ser uma planta bastante cultivada por diferentes populações (SIVIERO, 2020).

No Brasil, existem bancos de dados onde são conservados germoplasmas de mandioca, como o banco da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Instituto Agronômico em Campinas (IAC), os quais conservam aproximadamente quatro mil acessos do gênero *Manihot*. Deve-se salientar que existem outras formas de conservação da cultura utilizadas por pequenos produtores e também germoplasmas conservados em instituições acadêmicas para fins educativos (PINTO, 2017).

A caracterização do germoplasma é uma forma de documentar características herdáveis da planta, sendo possível identificar e separar geneticamente os acessos (AZEVEDO, 2010). Coletar e preservar o germoplasma, previne erosão genética dos cultivos e asseguram o acervo genético. Para que isso aconteça é primordial estabelecer metodologias padronizadas, as quais, quando utilizadas, revelam o polimorfismo nas sequências de DNA em indivíduos diferentes (NASCIMENTO, 2020).

A caracterização feita com o uso de marcadores moleculares é bem vantajosa, pois tem a finalidade de detectar e explorar polimorfismos do DNA, sendo valorizada por sua utilidade em diversas áreas que envolvem a genética e significa grande avanço no campo da genética molecular (TURCHETTO-ZOLET, 2017).

Os marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) apresentam alto nível de polimorfismo, potencial de reprodutibilidade, além de necessitar de quantidades baixas de DNA

na investigação genética, mapeamento e seleção de genes específicos (OLIVEIRA et al., 2021). São bastante utilizados pela sua eficiência em estudos de diversidade genética de populações, seleção de matrizes e bancos de germoplasma e por contribuir na conservação e no melhoramento genético da espécie estudada (FELIX et al., 2021).

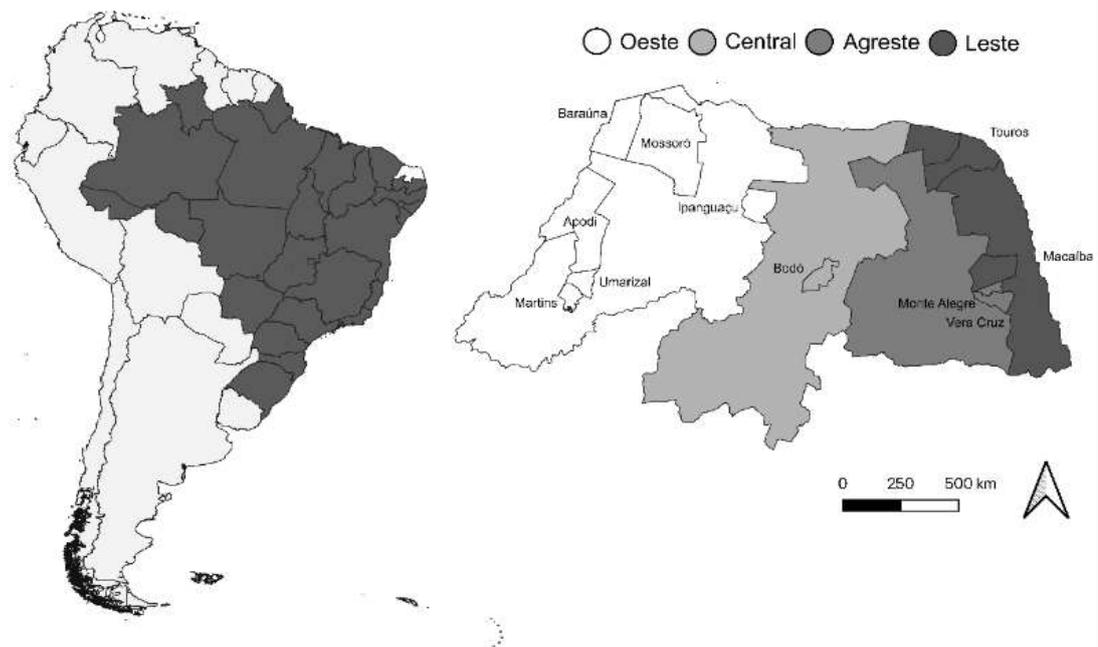
A análise da diversidade genética de uma espécie proporciona uma base essencial para otimizar a preservação do germoplasma. Estas pesquisas têm o potencial de promover avanços significativos no conhecimento sobre as suas variações genéticas e os desafios associados às características de interesse agrônomo. Ainda, ao traçar uma compreensão abrangente da diversidade genética, esse estudo estabelece uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de manejo e preservação, contribuindo para a segurança alimentar e o desenvolvimento sustentável em regiões tropicais e subtropicais.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de 63 acessos de mandioca brava e macaxeira por meio dos marcadores ISSR.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de coleta

A coleta dos acessos foi realizada no Campo Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN), no município de Apodi-RN, nas coordenadas geográficas  $-5^{\circ}37'10,44''$  S  $37^{\circ}49'11,128''$  W, Nordeste do Brasil (Figura 1). A região apresenta clima muito quente e semiárido, conforme a classificação climática de Köppen, com temperaturas média, máxima e mínima de 27,1; 34,1 e 22,8 °C, respectivamente.



**Figura 1-** Localização geográfica da origem dos acessos de mandioca brava e macaxeira, coletadas no Campo Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN).

### 2.2 Coleta do material botânico

Foram coletadas folhas jovens e saudáveis de 63 acessos de mandioca em plantações da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN). As mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixa térmica com gelo para Laboratório

de Biotecnologia Vegetal, localizado na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, onde foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise molecular.

As etnovarietades foram classificadas como macaxeira e mandioca brava e rotuladas com: código, número e nome da cultivar e local de origem (Tabela 1; Tabela 2).

**Tabela 1** – Etnoviedades de macaxeira coletadas no campo experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária, provenientes dos seguintes municípios descritos.

<b>Macaxeira</b>			
<b>Código</b>	<b>Nº da Cultivar</b>	<b>Nome</b>	<b>Localização</b>
MVC1	01	Branca	Vera Cruz
MVC2	07	Pernambucana	Vera Cruz
MVC3	59	Nunten	Vera Cruz
MVC4	60	Macaxeira Santo Antônio	Vera Cruz
MIP5	12	Branca	Ipanguaçu
MIP6	13	Preta	Ipanguaçu
MAP7	14	Macaxeira Apodi	Apodi
MUM8	20	Umarizal 1	Umarizal
MUM9	21	Umarizal 2	Umarizal
MUM10	22	Umarizal 3	Umarizal
MUM11	23	Umarizal 4	Umarizal
MMT12	24	Branca	Martins
MMT13	25	Macaxeiras de Goiás	Martins
MMT14	26	Manteiga	Martins
MBO15	29	Manteiga	Bodó
MBO16	30	Mulatinha	Bodó
MBO17	31	Pé de Paulo	Bodó
MBO18	32	Branca	Bodó
MBO19	35	Macaxeira	Bodó
MBO20	36	Branca do Agreste	Bodó
MMC21	39	BRS jari	Macaíba
MMC22	40	Gema de ovo	Macaíba
MMC23	41	Dourada	Macaíba
MMOJ24	47	Jucuri	Mossoró/Juassi
MMOJ25	48	Vermelha	Mossoró/Juassi
MBA26	49	Manteiguinha	Baraúna
MBA27	50	Branca	Baraúna
MMO28	51	Macaxeira rosinha	Mossoró/UFERSA
MMO29	52	Sempre Verde	Mossoró/UFERSA
MMO30	53	Tradicional Limoeiro do Norte	Mossoró/UFERSA
MMO31	54	Macaxeira Santo Antônio	Mossoró/UFERSA
MSI32	55	Macaxeira rosinha	*
MUF33	57	Água Morna	UFERSA
MUF34	58	Amarelo II	UFERSA
MUF35	61	Baixo Acu	UFERSA
MUF36	62	Recife	UFERSA
MUF37	63	Menina Boazinha	UFERSA
MUF38	64	Venâncio	UFERSA

\*Localização não identificada

**Tabela 2** – Etnovarietades de mandioca brava coletadas no campo experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária, provenientes dos seguintes municípios descritos.

<b>Mandioca Brava</b>			
<b>Código</b>	<b>Nº da Cultivar</b>	<b>Nome</b>	<b>Localização</b>
MBVC39	02	Verdinha	Vera Cruz
MBVC40	03	Cariri de Olho Branco	Vera Cruz
MBVC41	05	Burjaninha	Vera Cruz
MBMA42	04	Cariri	Monte Alegre
MBTO43	06	Alagoana	Touros
MBTO44	08	Alagoana Branca	Touros
MBTO45	09	Caipira	Touros
MBTO46	10	Cariri	Touros
MBTO47	11	Boinha	Touros
MBTO48	15	Cariri	Touros
MBTO49	16	Nove folhas	Touros
MBTO50	17	Pitangueira	Touros
MBTO51	18	Cacupira Preta	Touros
MBTO52	19	Alagoana Branca	Touros
MBMT53	27	Preta	Martins
MMT54	28	Branca	Martins
MBBO55	33	Olho Roxo	Bodó
MBBO56	34	Cacupira Preta	Bodó
MBMC57	37	BRS Novo Horizonte	Macaíba
MBMC58	38	Burjaninha	Macaíba
MBMC59	42	BRS Poti Branca	Macaíba
MBMC60	43	BRS Mulatinha	Macaíba
MBMC61	44	BRS Kiriris	Macaíba
MBMC62	45	2017-20-10	Macaíba
MBMC63	46	2017-51-30-06	Macaíba

### 2.3 Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990) com modificações baseadas em Faleiro et al. (2002). O material foi macerado na presença de nitrogênio líquido em cadinho e o pó obtido foi transferido para tubos de 2 mL e adicionado dois tipos de tampão de extração. O tampão de extração CTAB (Tris-HCl 100 µM, NaCl 1,4M), EDTA 20mM, CTAB 2%, PVP40, β-mercaptoetanol 0,2% e água Miliq q.s.p). Os tubos foram incubados em banho termostático a 70°C durante 60 minutos com homogeneização a cada 10 minutos. Finalizando essa etapa, foi adicionado solução de CIA aos tubos (clorofórmio-álcool-isoamílico 24:1), agitados por 10 minutos e submetidos a centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Feito isto, a fase superior foi transferida para outro tubo e adicionado CTAB 7%, homogeneizado e acrescentado mais 700 µl de CIA. Em seguida, foram submetidos a uma

nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Foi transferido o sobrenadante para tubo novo, e adicionado álcool isopropopanol, levadas ao congelador por 12 horas a -20°C. As amostras então foram lavadas com álcool 70% e 90%, respectivamente, e submetidas a novas centrifugações. O pellet obtido foi então ressuspense em solução de RNase (10µg/mL). A quantidade e qualidade do DNA isolado foi revelado através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) na presença de luz UV.

#### 2.4 Seleção de *primers* ISSR e reação de amplificação via PCR

Um teste prévio de polimorfismo com 23 marcadores ISSR (Tabela 3) foi realizado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a seleção dos *primers* que apresentaram ótimos padrões de amplificação. Os marcadores ISSR selecionados no teste de polimorfismo foram utilizados na amplificação do DNA para todos os acessos.

**Tabela 3** – *Primers* ISSR utilizados para a caracterização molecular nas 63 etnovarietades de mandioca coletadas no município de Apodi, Rio Grande do Norte, Brasil.

Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-----3')	TA (°C) <sup>1</sup>
DiCA3'YG	CACACACACACACAYC	58
DiCA5'CR	CRCACACACACACACA	58
DiCA5'CY	CYCACACACACACACA	50
DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAC	50
DiCA3'RC	GAGAGAGAGAGAGARC	50
DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAT	50
DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGAGA	50
TriCAC3'RC	CACCACCACCACCRC	55
TriGTG	GTGGTGGTGGTGGTG	55
TriGTG3'YC	GTGGTGGTGGTGGTYC	50
TriGTG5'CY	CYGTGGTGGTGGTGGTG	55
TriGTG3'RC	TGTTGTTGTTGTTGTRC	50
TriGTG5'CY	CYTGTTGTTGTTGTTGT	50
TriAAG3'RC	AAGAAGAAGAAGRC	47
TriATG3'RC	ATGATGATGATGATGRC	50
TriACA3'RC	ACAACAACAACAARC	47
TriAGG3'RC	AGGAGGAGGAGGAGGRC	47
TriTCA3'RC	TCATCATCATCATCARC	47
TriTCT3'RC	TCTTCTTCTTCTTRC	50
TriTCC3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	50
TriTGA3'RC	TGATGATGATGATGARC	50
TriCAT3'RC	CATCATCATCATATRC	50
TriCGA3'RC	CGACGACGACGACGARC	47

As ampliações com os ISSR foram realizadas em um volume final de 20  $\mu$ L, incluindo Tampão de Buffer 1x (50 mM de KCL; 200 mM de Tris-HCL, pH 8,4), MgCl 10 mM, primer 10 pmol, dNTP, 10 mM, 1 U de Taq DNA e 20ng de DNA. As amostras foram submetidas a ampliações em termociclador (Nexus, Eppendorf) com a seguinte programação: desnaturação inicial de 95°C por 4 min, seguida de 35 ciclos, desnaturação por 30s a 94°C, anelamento por 45 s, variando de 47°C a 58°C, a depender do *primer*, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio (0,5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e visualizadas sob luz UV em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador 100 pb “DNA Ladder Plus” (Sinapse Biotecnologia).

## 2.5 Análise Estatística

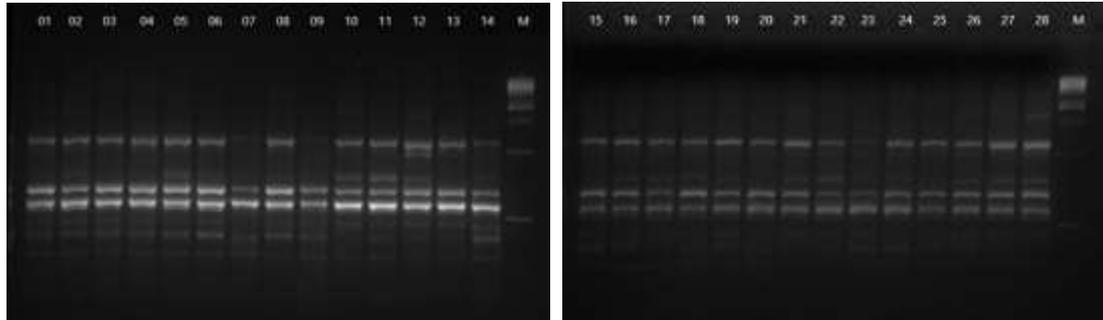
A matriz binária de presença (1) e ausência (0) de bandas foi organizada em uma planilha no Software Microsoft Excel e as análises de variância foram realizadas por meio de AMOVA.

Para analisar a similaridade dentre as variedades de mandioca brava e macaxeira foi utilizado o software NTSYS-pc 2.1 (Rolfh, 2000), calculando o coeficiente de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1901). Utilizou-se o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) para construção do dendrograma, e a partir dessa matriz foi obtido o coeficiente de correlação cofenética.

A avaliação da configuração genética entre os distintos acessos foi conduzida por meio do modelo Bayesiano. A inferência da estrutura genética foi realizada utilizando o programa STRUCTURE 2.3.4 (VAISHNAV et al., 2023).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão eletroforético de 28 etnov variedades de mandioca e macaxeira utilizando o primer TriTCC3'RC pode ser observado na figura 2.



**Figura 2** – Gel de agarose 2% demonstrando os produtos da amplificação de 28 acessos de *Manihot esculenta* com o marcador TriTCC3'RC. **M.** Marcador 100 pb (DNA Ladder Plus).

Os 23 *primers* utilizados apresentaram bom padrão de amplificação e geraram um total de 222 fragmentos, sendo, aproximadamente 90% destes compostas de bandas polimórficas. O número de bandas totais variou de três (TriTCA3'RC) a 14 (TriATG3'RC) e o número de bandas polimórficas variou de dois (TriTCA3'RC) a 12 (TriGTG5'CY) (Tabela 4), percentuais que confirmam que os marcadores ISSR detêm boa capacidade de detectar polimorfismo e diversidade genética entre as espécies de mandioca e macaxeira estudadas. Resultados satisfatórios como o apresentado neste estudo puderam ser também observados no trabalho de Dias (2022), o qual utilizou 23 *primers* ISSR, em 33 DNAs genômicos de *Calotropis procera*, gerando um total de 173 bandas polimórficas, tendo como percentagem média de polimorfismo (PP%) o valor de 89,60%.

**Tabela 4** – *Primers* ISSR utilizados, número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP), porcentagem de polimorfismo (%P), índice de conteúdo polimórfico (PIC), relação múltipla efetiva (EMR) e índice do marcador (MI).

<i>Primer</i>	NTF	NFP	%P	PIC	EMR	MI
DiCA3'YG	9	8	89%	0,32	7,11	2,30
DiCA5'CR	7	4	57%	0,14	2,29	0,33
DiCA5'CY	9	8	89%	0,06	7,11	0,43
DiGA3'C	11	11	100%	0,26	11,00	2,90
DiCA3'RC	11	10	91%	0,24	9,09	2,20
DiCA3'T	7	7	100%	0,17	7,00	1,19
DiGA5'CR	10	10	100%	0,48	10,00	4,76

TriCAC3'RC	9	7	78%	0,06	5,44	0,33
TriGTG	7	6	86%	0,38	5,14	1,93
TriGTG3'YC	10	10	100%	0,21	10,00	2,06
TriGTG5'CY	13	12	92%	0,39	11,08	4,32
TriGTG3'RC	12	12	100%	0,32	12,00	3,88
TriGTG5'CY	9	7	78%	0,22	5,44	1,19
TriAAG3'RC	6	5	83%	0,42	4,17	1,74
TriATG3'RC	14	12	86%	0,23	10,29	2,37
TriACA3'RC	12	12	100%	0,24	12,00	2,88
TriAGG3'RC	8	7	88%	0,26	6,13	1,59
TriTCA3'RC	3	2	67%	0,19	1,33	0,26
TriTCT3'RC	8	8	100%	0,39	8,00	3,10
TriTCC3'RC	11	8	73%	0,12	5,82	0,68
TriTGA3'RC	13	12	92%	0,28	11,08	3,15
TriCAT3'RC	13	13	100%	0,22	13,00	2,84
TriCGA3'RC	10	9	90%	0,16	8,10	1,26
Total	222	200				
Média			90%	0,24	8,00	2,06

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada primer variou entre 0,06 (-DiCA5'RC e TriCAC3'RC) a 0,48 (DiGA5'CR). Os *primers* DiGA5'CR, TriAAG3'RC, TriGTG5'CY, TriTCT3'RC, TriGTG, foram os que apresentaram os maiores valores (0,48, 0,42, 0,39, 0,39, 0,38, respectivamente) (Tabela 4), sendo indicados em futuros trabalhos com a espécie.

Segundo Botstein et al. (1980), marcadores moleculares com valores de PIC inferiores a 0,25 são considerados de baixa capacidade informativa, aqueles com valores entre 0,25 e 0,50 são considerados moderadamente informativos e valores acima de 0,50 são considerados altamente informativos. No presente estudo, foram identificados 13 *primers* com valores de PIC abaixo de 0,25, portanto classificados como pouco informativos. Por outro lado, dez *primers* demonstraram valores entre 0,25 e 0,50, indicando um nível moderado de informatividade na detecção de polimorfismo (Tabela 4).

Cuchi et al. (2022) também utilizaram em seus experimentos com *Manihot esculenta* Crantz, os marcadores ISSR e obtiveram 153 fragmentos. Com estes marcadores foi possível observar que houve eficiência em detectar polimorfismos entre as etnovariedades estudadas. Baseando-se no número de fragmentos amplificados citados pelo autor, que considera o valor (153) mínimo necessário para transmitir confiabilidade aos resultados, no presente estudo foi obtido valor superior (222).

O marcador ISSR, além de possibilitar a análise de locus múltiplos em uma única reação, promoveu a identificação da variação genética entre etnovariedades e apresentou eficácia abrangente na identificação de variabilidade genética intra e interespecífica do gênero *Manihot esculenta* Crantz (Tiago et al. 2016).

Os valores de similaridade genética, estimados a partir do coeficiente de Jaccard, variaram de 0,7456 a 0,7581, conforme apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5** – Similaridade genética entre os cinco principais pares de etnovariedades com maior e suas respectivas, distâncias genéticas.

	MBTO47	MBMT54	MB020	MBBO56	MUM10
MBTO46	0,7581				
MBMT53		0,7525			
MBO18			0,7500		
MBBO55				0,7480	
MUM9					0,7456

Através do software NTSYS, o método de agrupamento UPGMA revelou um Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) com um valor de 0,72317. Esse CCC foi empregado para avaliar o nível de confiabilidade entre a matriz de similaridade genética e os resultados obtidos a partir do processo de agrupamento. O coeficiente de correlação cofenética obtido demonstrou ser satisfatória, uma vez que coeficientes acima de 0,56 indicam uma concordância substancial entre as matrizes (VAZ PATTO et al., 2004). Conforme observado por Cruz e Carneiro (2003), à medida que o coeficiente de concordância cofenética aumenta, ocorre uma diminuição da distorção induzida ao agrupar os indivíduos, frequentemente alcançado por meio da aplicação da abordagem de ligação média (UPGMA).

O número de alelos ( $N_a$ ) variou entre 1,50 e 1,78, o número efetivo de alelos ( $N_e$ ) variou entre 1,30 e 1,41, sendo os maiores valores referentes aos acessos localizados na região Leste. A porcentagem de polimorfismo variou de acordo com a localização geográfica dos acessos, sendo a de menor valor da região Central com 50% e a de maior valor da região Leste com 77,93% (Tabela 6). O índice de diversidade genética e o índice de Shannon variaram de  $H_e=0,17$  e  $I=0,26$  para região Central e  $H_e=0,24$  e  $I=0,37$  para região Leste (Tabela 6). Segundo Reis et al. (2011) o índice de Shannon serve para quantificar a diversidade genética presente em uma população, sendo que valores mais próximos de zero indicam uma menor diversidade genética de acordo com essa definição e com os valores padrões do índice de Shannon, justificando o fato dos dois acessos proveniente da região Leste, serem mais similares.

A porcentagem de loci polimórficos gerada com a utilização de marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) reflete a proporção de locais específicos no genoma que exibem variação entre as amostras analisadas (CONNECT GENE, 2024). Ao avaliar a porcentagem de loci polimórficos em um conjunto de amostras, é possível analisar a diversidade genética nesses locais específicos. Uma alta porcentagem sugere uma maior diversidade genética entre as amostras, enquanto uma baixa porcentagem indica uma menor diversidade genética.

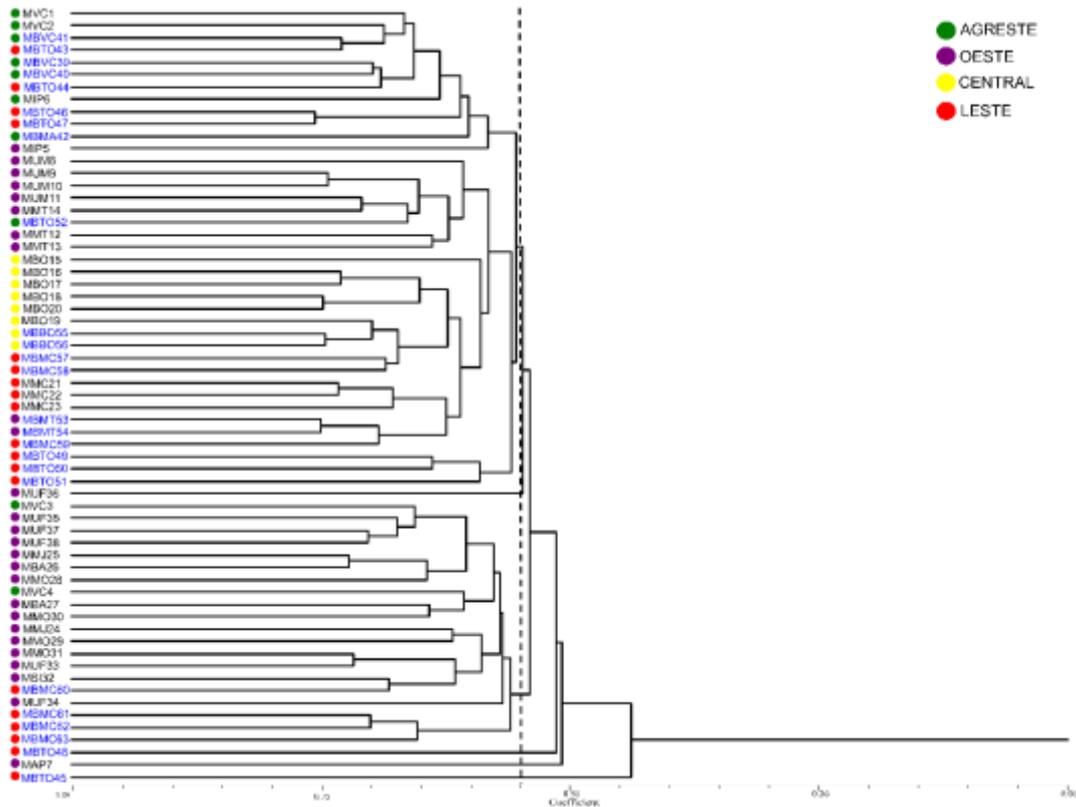
**Tabela 6** – Média dos índices de diversidade genética calculadas pelo programa GenAIEX para 23 *primers* ISSR em cultivares de mandioca brava e macaxeira.

	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>He</b>	<b>I</b>	<b>NPL</b>	<b>%P</b>
<b>Agreste</b>	1,63	1,38	0,23	0,35	140	63,06
<b>Oeste</b>	1,77	1,39	0,23	0,35	172	77,48
<b>Central</b>	1,50	1,30	0,17	0,26	111	50,00
<b>Leste</b>	1,78	1,41	0,24	0,37	173	77,93

Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivo de alelos); He (heterozigosidade esperada); I (índice Shannon); NPL (número de bandas polimórficas); %P (porcentagem de locus polimórficos)

Resultados semelhantes foram observados no estudo conduzido por Silva et al. (2023) sobre a diversidade genética do gênero *Desmanthus*. No referido estudo, constatou-se que o número médio de alelos (Na) foi de 1,76 e o número de alelos observados (Ne) foi de 1,49. No que se refere aos índices de variabilidade genética, a heterozigosidade esperada (He) e o Índice de Shannon (SI) revelaram valores de 0,28 e 0,42, respectivamente, indicando uma variação moderada a baixa de diversidade genética.

O dendrograma (Figura 3) representa as relações genéticas das etnovarietades de mandioca brava e macaxeira, nas quais foram identificados seis grupos heteróticos considerando uma distância média de 0,55 entre os grupos.



**Figura 3** – Dendrograma obtido pelo método UPGMA e complemento aritmético do índice de Jaccard como média de similaridade, em 63 etnovariedades de mandioca com base em 23 *primers* ISSR. Ponto de corte = 0,55%.

Quatro dos seis grupos foram formados somente com um único acesso: Grupo I (MBTO45), Grupo II (MAP7), Grupo III (MBTO48), Grupo V (MUF36), indicando a presença de etnovariedades únicas em termos de perfil genético, podendo ser resultado de seleção natural ou artificial feita pelos agricultores ao longo do tempo, levando à fixação de características específicas. Além disso, a falta de similaridade genética com outros acessos sugere que essas variedades podem ser importantes para a preservação da diversidade genética e para futuras estratégias de melhoramento. O acesso MBTO45 (Grupo I) representou a maior distância entre os demais acessos, indicando assim uma maior concentração de regiões genéticas únicas presentes nesse acesso.

O grupo IV foi formado por 20 acessos (MBMC63, MBMC62, MBMC61, MUF34, MBMC60, MSI32, MUF33, MMO31, MMO29, MMJ24, MMO30, MBA27, MVC4, MM028, MBA26, MMJ25, MUF38, MUF37, MUF35, MVC3) e o grupo VI foi formado por 39 acessos (MBTO51, MBTO50, MBTO49, MBMC59, MBMT54, MBMT53, MMC23, MMC22, MMC21, MBMC58, MBMC57, MBBO56, MBBO55, MBO19, MBO20, MBO18, MBO17, MBO16, MBO15, MMT13, MMT12, MBTO52, MMT14, MUM11, MUM10, MUM9,

MUM8, MIP5, MBMA42, MBTO47, MBTO46, MIP6, MBTO44, MBVC40, MBVC39, MBTO43, MBVC41, MVC2, MVC1).

Os grupos IV e VI foram os únicos à exibirem subgrupos em seus agrupamentos. A presença de subgrupos dentro dos grupos maiores pode indicar uma heterogeneidade genética dentro das regiões ou grupos específicos. Isso pode ser resultado de interações complexas entre fatores ambientais, fluxo gênico, seleção natural e práticas de manejo específicas de cada comunidade agrícola. A existência de subgrupos sugere que mesmo etnovariedades aparentemente semelhantes podem possuir adaptações genéticas distintas.

Observando os dados obtidos do dendrograma, é possível identificar diferentes padrões de agrupamento entre as etnovariedades de mandioca brava e macaxeira.

O grupo IV foi composto por 20 acessos incluindo os de macaxeira e mandioca brava, advindas da região Leste, Oeste e agreste, formando dois subgrupos. O primeiro subgrupo foi composto por três acessos, todos provenientes da região Leste. O segundo subgrupo foi composto por 17 acessos provenientes das regiões Leste, Oeste e Agreste. Entretanto, 82,4% desses acessos foram provenientes da região Oeste, demonstrando uma maior sub agrupamento dos acessos dessa região.

O grupo VI contém o maior número de acessos, 39 acessos, com quantidades quase equivalentes aos de macaxeira e mandioca, advindas das regiões Leste, Central, Oeste e Agreste, formando dois subgrupos. O primeiro subgrupo foi composto por 27 acessos provenientes de todas as regiões, entretendo, todos os acessos da região Central foram agrupados neste subgrupo. O segundo subgrupo foi composto por 12 acessos provenientes das regiões Leste, Oeste e Agreste, sendo que 67% dos acessos da região Agreste estão inseridos nesse sub agrupamento.

Os dados dos subgrupos dos grupos IV e VI sugerem que a maioria dos acessos das regiões Oeste e do Agreste foram agrupados em subgrupos específicos, identificando uma possível tendência desses acessos a serem agrupados por regiões devido a suas características genéticas. A tendência desses agrupamentos por regiões sugere que a estrutura genética pode ser influenciada pela distância geográfica e pelo fluxo gênico limitado entre diferentes áreas na maioria desses acessos subagrupados identificados. Agricultores de uma mesma região tendem a compartilhar material genético devido a fatores como proximidade geográfica, práticas agrícolas comuns e interações sociais. Essa troca frequente de material genético pode levar à formação de agrupamentos regionais distintos. Entretanto, o fato do não agrupamento de todos os acessos de uma mesma região pode estar relacionado justamente a esse compartilhamento de acessos e a movimentação do fluxo gênico entre essas regiões.

Em estudo com feijão caupí, Araújo et al. (2019) utilizaram marcadores ISSR para a avaliação da diversidade genética, detectaram seis grupos distintos no dendrograma gerado, os quais apresentaram uma distância média de 0,4366. Para todos os marcadores moleculares, foi possível encontrar semelhanças entre os genótipos, sendo que quatro destes genótipos apresentaram-se agrupados de acordo com as características agronômicas, enquanto que dois deles, foram separados baseando-se no marcador molecular. Isso pode ser explicado devido ao fato de que os marcadores ISSR tem grande capacidade de gerar informações discriminatórias.

A similaridade genética observada nos acessos dos grupos IV e VI sustenta a hipótese de uma potencial regionalização na diversidade genética de alguns acessos. Esses achados destacam a relevância da coleta de acessos provenientes de diversas regiões, a fim de enriquecer a variabilidade genética nas coleções de trabalho e nos bancos de germoplasma da espécie (CANDIDO, 2022) e compreender essas interações gênicas ocorridas nas diversas regiões e acessos avaliados.

No grupo VI estão presentes dois acessos de mandioca brava (MBTO46 e MBTO47), provenientes da região Leste e do município de Touros – RN, que apresentaram maior valor de similaridade genética. Essa similaridade genética entre as etnovariedades, refletida na proximidade no dendrograma, pode ser resultado de fatores como troca de material genético, seleção artificial e pressões seletivas semelhantes. Quando etnovariedades de diferentes regiões compartilham características genéticas semelhantes, isso pode indicar a existência de uma rede de troca de germoplasma, onde agricultores de diferentes áreas colaboram na manutenção da diversidade. De acordo com Figueredo et al. (2019), em seu estudo utilizando marcadores ISSR em etnovariedades de mandioca, observaram duas variedades com o maior valor de similaridade e nos afirmam, baseado nos conceitos de Albuquerque (2009), que as variações podem ter sido fruto de uma fecundação intrapopulacional ou seleção dentro da própria roça do agricultor

Por contraste, o acesso MBTO45 exibiu uma distância genética mais significativa em relação aos demais acessos. Isso sugere que ele pode ser considerado uma etnovariabilidade de maior importância na seleção de plantas para o desenvolvimento de linhagens segregantes promissoras. O fato do acesso MBTO45 ser da mesma região de acessos como MBTO46 e MBTO47 e esses não apresentarem essa distância genética pode ser justificada pelo recebimento no acesso MBTO45 de genes de outras regiões, aumentando sua diversidade genética e resultando em uma maior distância genética em relação a outras variedades locais. Outra justificativa pode estar relacionada devido a um possível isolamento reprodutivo.

Possíveis barreiras reprodutivas podem ter reduzido a troca de genes do MBTO45 com outras variedades locais, resultando em uma maior distância genética desse acesso.

Rondon, Tiago e Hoogerheide (2023) em estudo com mandioca, a análise do dendrograma revelou a divisão em cinco grupos distintos. A etnovarietade Matrinã (RC10) se destacou como a mais distante dos demais grupos, demonstrando a maior divergência em relação às outras variedades. Essa observação pode ser compreendida considerando as diferenças nos alelos presentes nas etnovarietades analisadas, possivelmente relacionadas a características morfoagronômicas, como a coloração da polpa das raízes.

Outro achado relevante do presente estudo está relacionado a presença de 80% dos acessos do grupo IV serem de macaxeira e somente 20% de mandioca brava. Isso levanta a hipótese de um potencial agrupamento genético entre as duas etnovarietades. Contudo, o grupo VI não apresentou esse mesmo resultado, tendo uma proporção semelhante de macaxeira e de mandioca brava.

É importante salientar que a *Manihot esculenta* Crantz, é um tubérculo, se reproduz de forma sexuada, o que resulta em uma possibilidade de amplificação da diversidade genética. Esse processo possibilita aos melhoristas a oportunidade de escolher genótipos com maior relevância agrônoma (SILVA, 2001). Segundo Fukuda; Silva (2002), a variabilidade genética apresentada pela cultura é decorrente da seleção, da domesticação, da facilidade de polinização cruzada, da alta heterozigosidade e da deiscência abrupta dos frutos.

Com base no que foi apresentado, é evidente que, apesar do grande número de variedades de mandioca brava e macaxeira, demonstraram características semelhantes, especialmente as dos grupos IV e VI. Conforme observado por Pedri et al. (2021), esse fenômeno pode ser atribuído à interação entre os agricultores, que frequentemente compartilham material vegetal (como manivas) entre si, gerando um fluxo de troca que abrange não apenas diferentes municípios, mas também regiões geográficas distintas.

#### **4. CONCLUSÃO**

Em síntese, os resultados apresentados neste estudo evidenciam a eficácia dos marcadores ISSR na diferenciação molecular de acessos de mandioca brava e macaxeira. Esses marcadores revelaram informações consistentes sobre a variabilidade genética entre as variedades analisadas. Foi possível estabelecer um conjunto de marcadores que poderão ser utilizados para identificação de etnovariedades, facilitando a gestão do germoplasma e orientando a seleção de variedades com características desejáveis.

Além disso, destaca a importância da colaboração entre comunidades agrícolas e pesquisadores. Essa parceria é essencial para preservar e promover a diversidade genética, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO et al. Genetic structure of cassava populations (*Manihot esculenta* Crantz) from Angola assessed through (ISSR) markers. **African Journal Biotechnology**, vol. 18(7), pp. 144-154, 2019.
- ALBUQUERQUE et al. Caracterização morfológica e agrônômica de clones de mandioca cultivados no Estado de Roraima. **Revista Brasileira Ciências Agrárias**, Pernambuco, 4 (4), 388-394.
- ARAÚJO et al. Agronomic potential and genetic diversity of landraces of cowpea from the state of Ceará. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 3, p. 698 – 708, jul-set., 2019.
- AZEVEDO, Vânia Cristina Rennó. Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Molecular. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília – DF, 2010;
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686077/>>. Acesso em: 15 de ago. 2023.
- CANDIDO, Danieli Fernanda. Cultivo in vitro, Diversidade genética e Análise bibliométrica de mandioquinha-salsa. Pato Branco, 2022. 55 p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- CARRASCO et al. Growing Cassava (*Manihot esculenta*) in Mato Grosso, Brazil: Genetic Diversity Conservation in Small-Scale Agriculture. **Economic Botany**, 70(1), 2016, pp. 15-28.
- CONNECT GENE. **Caracterização Genética**. Disponível em: <<https://www.connectgene.com/carateriza%C3%A7%C3%A3ogen%C3%A9tica#:~:text=%2DO%20n%C3%BAmero%20de%20bandas%20polim%C3%B3rficas%20s%C3%A3o%20o%20n%C3%BAmero%20de%20bandas,ou%20aus%C3%AÂncia%20de%20banda%20Flocus>>. Acesso em: 26 de fev. 2024.
- CUCHI et al. **Caracterização molecular de etnovariedades de *Manihot esculenta* Crantz com utilização de marcadores moleculares ISSR**. Conjecturas, Vol. 22, N° 13. 2022.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético** Viçosa: UFV, 2003. v.2. 585p.
- DIAS et al. Amplification and selection profile of ISSR markers for genetic studies in *Calotropis procera*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 35, n. 3, p. 739-746, jul. – set., 2022.
- FALEIRO et al. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. **Agrotrópica**, Ilhéus, 2002.
- FELIX et al. Applications of issr markers in studies of genetic diversity of *Pityrocarpa moniliformis*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 33, n. 4, p. 1017 – 1024, 2021;

- FIGUEREDO et al. Diversidade genética de mandiocas na região periurbana de Sinop, Mato Grosso, Brasil. **Magistra**, v. 30, p. 143-153, 2019.
- FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. E. Melhoramento de mandioca Brasil. In: Cereda, M. P. (org.). Agricultura: Tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: **Fundação Cargil**, 2002. p. 242-257.
- GONÇALVES, T. M. Caracterização, divergência genética e estrutura populacional de cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa coletadas na Região Sul de Minas Gerais. 1ª edição. Iguatu – Ceará. **Quipá Editora**. 2021.
- HAIR JUNIOR, J. F. et al. Análise multivariada de dados. 6. ed. **Porto Alegre: Bookman**, 2009. 688 p. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788577805341>>. Acesso em: 11 jul. 2022.
- JACCARD P. Étude comparativo da distribuição florale dans une portion des Alpes et des Jura. Touro. **Soc. Sci. Vaudoise**. Nat. 37: 547-579. 1901.
- JAFARI et al. Genetic differentiation between bitter and sweer asafetida plants using ISSR markers. **Molecular Biology Reports**, 2019.
- KUMAR et al. Assessment og genetic diversity among okra genotypes using SSR markers. **J. Plant Biochem. Biotechnol**, 2017, 26(2): 172-178.
- MOURA et al. Molecular characterization of acessions of a rare genetic resource: sugary cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Brazilian Amazon. **Genet Resour Crop Evol**, 2016, 63:583-593.
- NASCIMENTO et al. Identificação e caraterização morfológica de variedades de mandioca na Comunidade São João do Araçá. Itacoatiara, AM. **Anais da XVI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**, 2020.
- OLIVEIRA et al. Principal molecular markers. Research, **Society and Development**, v. 10, n. 15, p., 2021.
- ONO et al. Fungi and mycotoxins in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its products. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, e2020240, 2021.
- PEDRI, E. C. M. et al. Diversidade genética entre etnovariedades de mandioca cultivadas no norte do estado de Mato Grosso por meio de descritores morfoagronômicos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e25410514871-e25410514871, 2021.
- PINTO, Karla Nyanne Carvalho Pinto. Diversidade genética em coleção didática de germoplasma de mandioca da UFERSA por descritores morfológicos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2017.
- PINTO, Karla Nyanne Carvalho Pinto. Diversidade genética em coleção didática de germoplasma de mandioca da UFERSA por descritores morfológicos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2017.

- RAO et al. Genetic diversity analysis of greater yam (*Dioscorea alata* L.) genotypes through RAPD and ISSR markers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** **23**, 2020, 101495.
- REIS, R. V. DOS et al. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 55-57, jan. 2011.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. **Exeter Publishing Setauket**, New York, 2020.
- RONDON, M. J. P.; TIAGO, A. V.; HOOGERHEIDE, E. S. S. Conservação da mandioca na fazenda em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil: aspectos etnobotânicos e diversidade genética. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 53, e73659, 2023.
- SILVA et al. Exchange of germoplasm and genetic diversity to enrich the *Desmodium* genebank. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 36, n. 1, p. 33-40, jan-mar., 2023.
- SILVA et al. Genetic diversity and population structure of *Eplingiella* species (Lamiaceae) using ISSR markers. **Genet Resour Crop Evol**, 2023.
- SILVA et al. Growth, productivity and viability of irrigation in cassava crop in the Alagoas Coastal Plateau. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 52:4, e20210145, 2022.
- SILVA, A. R. da. Métodos de agrupamento: avaliação e aplicação ao estudo de divergência genética em acessos de alho. 2012. 67 f. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- SILVEIRA et al. Quality of table cassava roots fertilized with phosphorus. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 34, n.4, p. 965-975, 2021.
- SIVIERO et al. Agrobiodiversidade de Mandioca do Acre. **EMBRAPA**. Cap. 15, p. 224-237, 2020.
- STEFANELLO et al. Manejo da podridão radicular da mandioca pela combinação de manejo de solo, variedade resistente e controle biológico com *Trichoderma harzianum*. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v.13, n° 1, p. 31-45, 2017.
- TIAGO, A. V. et al. Genetic diversity in cassava landraces grown on farms in Alta Floresta-MT, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1–10, 2016. DOI: 10.4238/gmr.15038615
- TURCHETTO-ZOLET et al. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, 2017.
- VAZ PATTO MC, SATOVIC Z, PÊGO S. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**. 137: 63-67.

VAISHNAV et al. Estimation of genetic diversity and population genetic structure in *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. Ex Schult. Populations using DAMD and ISSR markers. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2023.

WANG et al. Molecular diversity analysis, drought related marker-traits association mapping and Discovery of excelente alleles for 100-day old plants by EST-SSRs in cassava germplasms (*Manihot esculenta* Crantz), **PLoS ONE** 12(5), 2017.

ZUFFO et al. Ciência em Foco. **Pantanal Editora**, cap. 2, Nova Xavantina – MT, 2019;

## CAPÍTULO II

### SIMILARIDADE GENÉTICA DE *Fusarium* spp. ISOLADOS DE PLANTIOS COMERCIAIS DE MANDIOCA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL

#### RESUMO

O gênero *Fusarium* tem ampla distribuição geográfica, está presente em solos, plantas, ar e alimentos. Possui mais de 300 espécies filogeneticamente diferentes e é responsável por ocasionar doenças em muitas espécies de plantas de importância econômica. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar caracterização morfológica e a diversidade genética de *Fusarium* spp. por meio de marcadores moleculares ISSR. Amostras de *Fusarium* spp foram isoladas de seis variedades de mandioca e três de macaxeira, no qual os mesmos tiveram seus DNAs extraídos e amplificados via PCR utilizando-se 24 *primers* ISSR. Para a construção do dendrograma utilizou-se o método UPGMA. Na caracterização molecular, foram gerados 199 fragmentos, sendo 99% de bandas polimórficas. O primer UBC-808 foi o único que apresentou um locus monomórfico dos 11 gerados, sendo 90,91% de polimorfismo. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada primer variou entre 0,20 (UBC-847) a 0,39 (UBC-812). No dendrograma formaram-se três grupos. O grupo I foi composto pelo isolado 06sr, o grupo II foi formado por sete isolados, 30ap, 18ap, 10ap, 11ap, 08sr, 08ap e 7ap, e o grupo III composto pelo isolado 06ap. Foi observado que o isolado 06sr apresentou maior distância genética quando comparado aos demais isolados, com uma média baixa de similaridade, em torno de 0,1630, justificando assim, o fato de o mesmo apresentar morfológicamente, uma coloração diferente de todos os outros isolados. Os isolados 06sr, 07sr, 08sr pertencem às mesmas plantas de macaxeira, porém, morfológicamente e molecularmente comportaram-se de maneiras distintas, quando comparadas entre si. Os resultados obtidos neste estudo permitiram observar que há correlação entre a variabilidade genética apresentada pelos isolados de *Fusarium* spp e a região geográfica da qual são provenientes. Ainda, foi possível observar que os marcadores ISSR foram úteis em avaliar a diversidade genética da espécie e que, aliada à caracterização morfológica, são necessárias e relevantes para o manejo adequado de doenças de plantas.

**Palavras-chave:** Fitopatógeno, Morfologia, Biotecnologia.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* foi inicialmente descrito em 1809 pelo micologista alemão Link. Em 1935, Wollenweber e Reinkg dividiram o gênero, que originalmente compreendia mais de 1000 indivíduos, em 16 seções, abrangendo 65 espécies, 55 variedades e 22 formas, baseando-se nas características morfológicas como critério de separação (NELSON, 1991). Foram identificadas diversas espécies, originando Complexos que abrangem um conjunto de organismos diferenciados geneticamente. Isso inclui o Complexo *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, que consiste em espécies geneticamente distintas (CROUS et al., 2021).

É um gênero que pertence ao filo Ascomycota, à subdivisão Pezizomycotina, à classe Sordariomycetes, à subclasse Hypocreomycetidae, à ordem Hypocreales e à família Nectriaceae (INDEX, FUNGORUM, 2024). Devido as variações que existem em sua morfologia, patogenicidade e variabilidade genética, há uma grande quantidade de espécies (OLIVEIRA & COSTA, 2002). Este gênero é um dos principais agentes causadores de danos e doenças, devido a sua ação patogênica, levando a grandes impactos econômicos (SAREMI et al., 1999; SUMMEREL, 2019; HOF, 2020).

Este fungo possui ampla distribuição geográfica, está presente em solos, plantas, água, ar e alimentos (SILVA, 2023). Segundo Félix (2018), é considerado cosmopolita com ampla gama de hospedeiro, podendo introduzir substâncias tóxicas em humanos e animais, conhecidas por micotoxinas, como tricotocenos, fumoniosinas, zearalenona, monilioformina e o ácido fusárico. Estas substâncias têm um impacto adverso na produção animal, podendo resultar em problemas de saúde e redução da produtividade (SUMMEREL, 2019).

O gênero possui mais de 300 espécies filogeneticamente diferentes (NUCCI et al., 2021). As diferentes espécies de *Fusarium* apresentam morfologia de cores quando cultivadas em meios de cultura adequados, possuem hifas hialinas, septadas e ramificadas com bifurcações em ângulo agudo onde formam-se macroconídios típicos, podendo variar em forma, tamanho e número (LESLIE e SUMMERELL, 2006; HOF, 2020).

Embora a maioria das espécies de *Fusarium* habite o solo, seus conídios podem ser disseminados pela água, através de respingos de chuva e sistemas de irrigação. Quando secos, esses conídios tornam-se suspensos no ar, facilitando sua dispersão por longas distâncias na atmosfera e contribuindo para sua disseminação global. Estes fungos são hemibiotróficos com capacidade de fazer transição para necrotróficos, a depender de qual estímulo recebe do ambiente e de metabólitos específicos, causam podridão de raiz e caule, murcha vascular e

podridão em frutas de várias culturas economicamente importantes, levando a grandes perdas de rendimento (SEPHRA, 2019).

Para identificar as espécies do gênero é necessário utilizar critérios morfológicos e culturais, que se baseiam nas características da colônia, incluindo cor, forma, textura e crescimento e por meio de características microscópicas (GUARRO e GENÉ, 1992; LESLIE E SUMMERELL, 2006). Não existe dificuldade para a identificação do gênero, porém, quando se refere a nível de espécie é importante ter uma abordagem mais profunda, utilizando métodos moleculares para obter resultados precisos (HOOG et al., 2001; GUARRO, 2013). Os marcadores moleculares tem sido amplamente utilizados para identificação de diversas espécies fúngicas (GURJAR et al., 2009; SANTOS et al., 2011; JEEWON et al., 2013), portanto, trabalhos com esse intuito, permitem que a variabilidade de isolados se torne conhecida dentro de um determinado gênero, gerando informações que ajudam na implementação de estratégias de controle e manejo de doenças (TOZZE JÚNIOR et al., 2006).

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética de isolados de *Fusarium* spp. por meio de marcadores moleculares ISSR.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material fúngico

A coleta dos isolados nos acessos de mandioca brava e macaxeiras sintomáticas, foi realizada no Campo Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN), no município de Apodi-RN, nas coordenadas geográficas -5°37'10,44" S 37°49'11,128" W, Nordeste do Brasil. A região apresenta clima muito quente e semiárido, conforme a classificação climática de Koppen, com temperaturas média, máxima e mínima de 27,1; 34,1 3 22,8 °C, respectivamente. A segunda coleta foi realizada no Assentamento São Romão, no município de Mossoró-RN, nas coordenadas geográficas -4.907289,-37.442094, Nordeste do Brasil. A região apresenta clima quente e seco, conforma a classificação de Koppen, com temperatura média anual de 27,5°C.

Foram coletados isolados de nove acessos, sendo seis variedades de mandioca brava e três de macaxeira (Tabela 1). Elas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixa térmica com gelo para Laboratório de Fitopatologia I, localizado na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, onde foram armazenadas a -20°C para posterior análise molecular.

**Tabela 1** – Isolados monospóricos de *Fusarium* spp. coletados em plantas de mandioca brava e macaxeira em municípios do Rio Grande Norte para estudos de diversidade genética.

<b>Isolado</b>	<b>Município</b>	<b>Etnovariedade</b>	<b>Nome popular das etnovariedades</b>
06ap	Touros	Mandioca brava	Alagoana
06sr	Mossoró	Macaxeira	-
07sr	Mossoró	Mandioca brava	-
08ap	Touros	Mandioca brava	Alagoana Branca
08sr	Mossoró	Macaxeira	-
10ap	Touros	Mandioca brava	Cariri
11ap	Touros	Mandioca brava	Boinha
18ap	Touros	Mandioca brava	Cacupira Preta
30ap	Bodó	Mandioca brava	Mulatinha

ap: Apodi; sr: São Romão

### 2.2 Isolamento dos fungos

Cada amostra consistiu em cinco fragmentos de raízes, os quais foram utilizados para os procedimentos de isolamento. Esses fragmentos foram submetidos a um processo de assepsia, passando por diferentes etapas: imersão em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, água destilada esterilizada por 1 minuto e, por fim, colocados em papel filtro para secagem. Após o completo processo de secagem, os fragmentos foram dispostos em placas de Petri contendo meio de cultura composto por Batata-Dextrose-Ágar (BDA) + Tetraciclina (0,05g/L). Posteriormente ao crescimento das colônias dos fungos, estas foram transferidas para novas placas de Petri contendo meio BDA + Tetraciclina (0,05g/L) por meio da repicagem.

Os isolados (Tabela 1) foram armazenados no Laboratório de Fitopatologia I da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), utilizando o método de Castellani (1939).

### 2.3 Caracterização morfológica dos fungos

As colônias foram transferidas para meio BDA e mantidas em incubação por sete dias a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram realizadas culturas monospóricas a partir de uma suspensão de esporos, utilizando água destilada esterilizada. Com o auxílio de uma pipeta, 1 mL da solução de esporo foi transferido para placas de Petri contendo o meio Ágar-água (AA), onde foram incubados por 12 h a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . As placas foram examinadas sob um microscópio e com auxílio de agulha hipodérmica, um único esporo germinado foi transferido para placa contendo meio de cultura BDA. Essas placas foram então colocadas em incubadora BOD, mantendo-se a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h.

Os isolados monospóricos foram submetidos a análises microscópicas detalhadas e comparados com descrições disponíveis na literatura. As características morfológicas foram avaliadas e documentadas por meio de fotografias. Para exame microscópico, foram avaliadas a presença de macroconídios, microconídios e clamidósporos, sob um microscópio confocal usando ampliações de 10x e 40x.

A cor predominante da colônia foi observada após um período de incubação de 14 dias no meio de cultura BDA, mantido a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  como fotoperíodo de 12h. A coloração do verso e reverso foi comparada as descritas por Nelson et al. (1983).

### 2.3 Caracterização molecular dos fungos

Os isolados foram submetidos ao processo de identificação molecular no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA.

### 2.3.1 Extração de DNA

Após isolamento e identificação morfológica dos fungos, o DNA dos mesmos foram extraídos seguindo o protocolo SDS (SMITH et al. 2001). O micélio foi macerado com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana até a obtenção de pó fino, sendo transferido para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração SDS, [SDS 10%; Tris-HCL 1 M pH 8,0; NaCl 5 M; EDTA 0,20 M; CTAB 7%; PVP 1%; β-mercaptoetanol 2% e água ultrapura q.s.p] aos tubos nos quais foram incubados em banho termostático a 65°C por 40 minutos. Ao fim da etapa, foi realizada a separação de fases com clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado álcool isopropílico incubado a -20°C por ± 12 horas. Os tubos passaram por um processo de lavagem, com álcool 70% e 90%, respectivamente. O pellet obtido foi ressuspensão em solução de RNase (10µg/mL), e o DNA extraído dos isolados foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP) sob luz UV.

### 2.3.2 Seleção de *primers* ISSR e reação de amplificação via PCR

Inicialmente foi conduzido um teste preliminar de polimorfismo utilizando 28 marcadores ISSR por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), com a finalidade de selecionar os *primers* que exibiram padrões ideais de amplificação. Os 24 marcadores ISSR (Tabela 2) identificados como adequados durante o teste de polimorfismo foram posteriormente empregados na amplificação do DNA de todos os isolados.

**Tabela 2** – Sequência de *primers* ISSR e temperatura de anelamento utilizados para a caracterização molecular dos nove isolados de *Fusarium* spp.

Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-----3')	TA (°C)*
UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	47,6
UBC-810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	45,2
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	47,6
UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	45,2

UBC-823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	47,6
UBC-825	ACACACACACACACT	45,2
UBC-826	ACACACACACACACC	47,6
UBC-828	TGTGTGTGTGTGTGA	45,2
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGYT	47,3
UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGYC	49,5
UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGYA	47,3
UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAYT	47,3
UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAYC	49,5
UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAYG	49,5
UBC-846	GAGAGAGAGAGAGAA	45,2
UBC-847	CACACACACACARC	49,5
UBC-848	CACACACACACARG	49,5
UBC-850	GTGTGTGTGTGTGYC	49,5
UBC-852	TCTCTCTCTCTCTCCRA	50,4
UBC-855	ACACACACACACACYT	47,3
UBC-856	ACACACACACACACYA	47,3
UBC-857	ACACACACACACACYG	49,5
UBC-866	CTCCTCCTCCTCCT	52,4
UBC-889	DBDACACACACACAC	46

---

\*Temperatura de Anelamento

As amplificações com os ISSR foram realizadas em um volume final de 20  $\mu$ L, incluindo Tampão de Buffer 1x (50 mM de KCL; 200 mM de Tris-HCL, pH 8,4), MgCl 10 mM, primer 10 pmol, dNTP, 10 mM, 1 U de Taq DNA e 20ng de DNA. As amostras foram submetidas a amplificações em termociclador (Nexus, Eppendorf) com a seguinte programação: desnaturação inicial de 95°C por 4 min, seguida de 35 ciclos, desnaturação por 30s a 94°C, anelamento por 45 s, variando de 47°C a 58°C, a depender do *primer*, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), utilizando gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio (0,5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e visualizadas sob luz UV em fotodocumentador (Proteinsimple, Alphaimager HP). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador 100 pb “DNA Ladder Plus” (Sinapse Biotecnologia).

## 2.4 Análise Estatística

Foi organizada em uma planilha utilizando o Software Microsoft Excel, para organizar a matriz binária, representando a presença (1) ou ausência (0) de bandas. As análises de variância foram conduzidas por meio do método AMOVA (Análise Molecular de Variância).

A similaridade dos isolados de *Fusarium* spp., foi analisada empregando o software NTSYS-pc 2.1 (ROLFH, 2000). Este software foi usado para calcular o coeficiente de similaridade de Jaccard (JACCARD, 1901). Para a construção do dendrograma utilizou-se o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages). A partir dessa matriz, foi obtido o coeficiente de correlação cofenética.

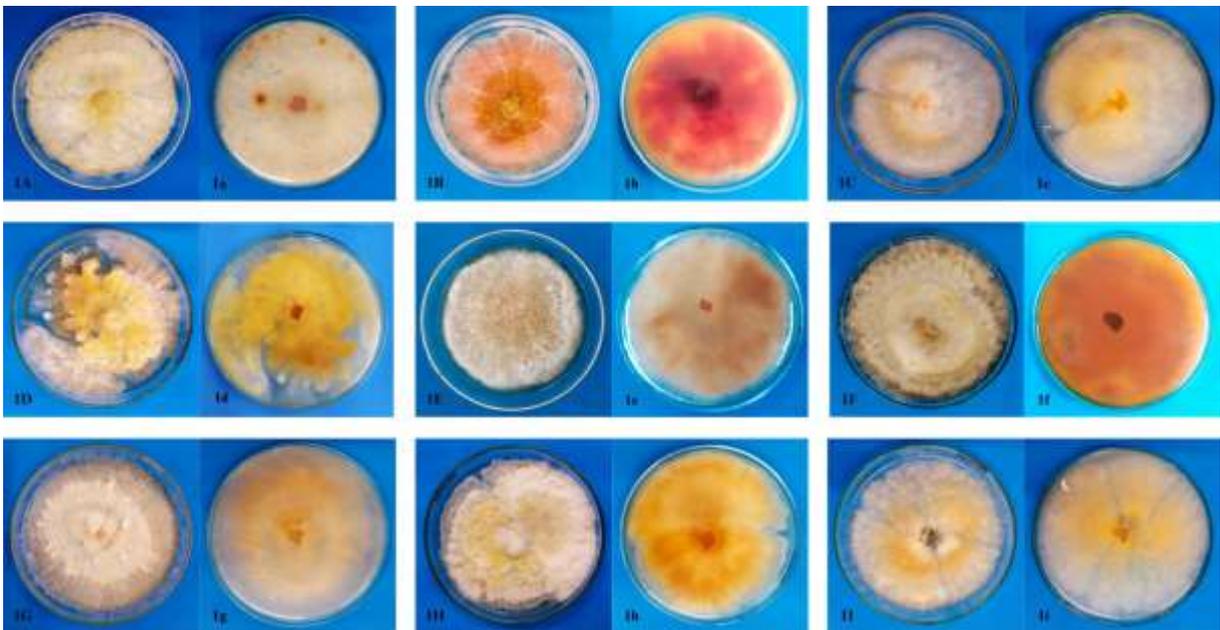
A análise da configuração genética entre os isolados foi realizada por meio de um modelo Bayesiano. A inferência da estrutura foi conduzida utilizando o programa STRUCTURE 2.3.4 (VAISHNAV et al., 2023).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp.

A pigmentação das colônias, bem como estruturas reprodutivas são bastante utilizados na caracterização morfológica de *Fusarium* spp. A caracterização morfológica por meio da coloração pode indicar a ocorrência de diferentes espécies de *Fusarium* entre os isolados avaliados. Além disso, os achados obtidos em relação a coloração, sugerem que em uma mesma planta há a ocorrência de diferentes espécies desse fungo, assim como, entre os materiais vegetais utilizados, pode haver a presença de uma mesma espécie (Figura 1).

Letra maiúscula: Verso da placa; Letra minúscula: Reverso da placa.



**Figura 1** – Coloração do verso e reverso do micélio aéreo dos nove isolados de *Fusarium* spp. em meio BDA após 14 dias de incubação. Isolados: 1A/1a: 06ap; 1B/1b: 06sr; 1C/1c: 07sr; 1D/1d: 08ap; 1E/1e: 08sr; 1F/1f: 10ap; 1G/1g: 11ap; 1H/1h: 18ap; 1I/1i: 30ap.

No Brasil, diversas espécies de *Fusarium* causam doença na mandioca, incluindo *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, conforme relatado por Vilas Boas et al. (2016). Vários estudos de caracterização incluem a pigmentação das colônias como um atributo relevante e sugerem que há diferenças de espécies baseando-se nas colorações. Ramdial et al. (2016) observaram que, *Fusarium incarnatum* tem micélio aéreo bastante denso e coloração branca e no reverso da placa coloração variando de creme a salmão. *Fusarium solani* também apresentou micélio aéreo denso, porém com colônias de coloração branca (FU; LIU; LI, 2017). Já *Fusarium Oxysporum*, quando cultivado em meio BDA, exibiu colônias que variaram de salmão a rosa (TAYLOR et al., 2017).

Observou-se na figura 1B/2B, que o isolado 06sr apresentou coloração rosa com salmão, obtida de um isolado de uma planta cultivada em Mossoró, pode ser um indicativo de uma espécie diferente. Portanto, a partir dessas análises que descreveram diversas colorações de *Fusarium* spp., nota-se que, embora a pigmentação das colônias seja uma característica que contribui para a caracterização e identificação desses patógenos, é essencial agregar outros caracteres. Isso ocorre porque espécies diferentes podem apresentar sobreposição de cores, e isolados da mesma espécie podem expressar colorações distintas, mesmo quando cultivados em ambientes com condições semelhantes (TAYLOR et al., 2017).

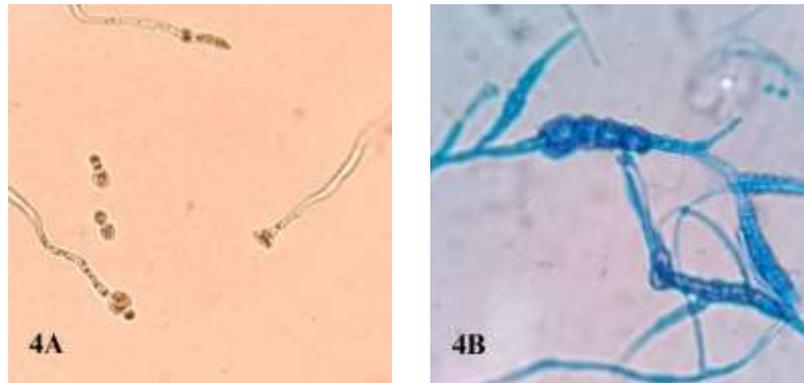
A pigmentação faz parte do processo de crescimento do fungo e pode ser utilizada como ferramenta para estudos de crescimento como alternativa à expansão de tamanho (CAMBAZA et al., 2018). As cores da superfície mudam dependendo de diversas variáveis, como deformação, maturidade, nutrientes, temperatura, pH, atividade de água, exposição à luz e aeração (ASHLEY et al., 1937, BAKER; ROBERTS, 1966, KIM et al., 2014, CAMBAZA et al., 2018).

Os macroconídios são caracterizados por apresentar forma de foice, com três a cinco septos, a maioria com três septos, enquanto os microconídios são elipsoides a fusoides, com zero a um septo, sendo a maioria com um septo (MA et al., 2023) (Figura 3).



**FIGURA 2-** Formação de estruturas de *Fusarium* spp. (3A) microconídios e (3B) macroconídios.

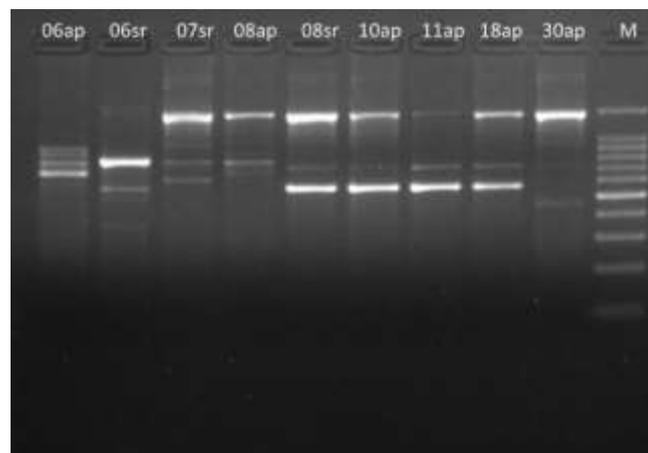
Outra estrutura de extrema importância nas espécies de *Fusarium* são os clamidósporos (Figura 4), estruturas de resistência, que desempenham um papel fundamental na sobrevivência do fungo em condições adversas (TOFOLI; DOMINGUES, 2022). No presente trabalho, observou-se que os alguns isolados expressaram a presença de clamidósporos. Os clamidósporos parecem esféricos, intercalares e formados em cadeias com uma exina lisa nas culturas (MA et al., 2023).



**FIGURA 3** – Clamidósporos jovens e crescimento da hifa do clamidósporo (4A) e a clamidósporos (4B).

### 3.2 Caracterização molecular dos isolados de *Fusarium* spp.

O padrão eletroforético de nove isolados de *Fusarium* spp. utilizando o primer UBC-825 pode ser observado na figura 5.



**Figura 4** – Padrão de amplificação dos DNAs dos nove isolados de *Fusarium* spp. com o primer ISSR UBC-825 em gel de agarose a 2%. DNAs (06ap, 06sr, 07sr, 08ap, 08sr, 10ap, 11ap, 18ap e 30ap). M: Marcador de peso molecular 100 pb (DNA Ladder Plus).

A partir da caracterização molecular dos isolados foi possível identificar a presença de um total de 199 bandas de DNA, aproximadamente 99% destas, foram compostas de bandas polimórficas. O número total de fragmentos amplificados (NTF) e o número de bandas polimórficas (NFP) variou de dois (UBC-847) a treze (UBC-826), respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3** – Primers ISSR utilizados em DNAs dos nove isolados de *Fusarium* spp., número total de fragmentos amplificados (NTF), número de fragmentos polimórficos (NFP),

porcentagem de polimorfismo (%P), índice de conteúdo polimórfico (PIC), relação múltipla efetiva (EMR) e índice do marcador (MI).

<b>Primer</b>	<b>NTF</b>	<b>NFP</b>	<b>%P</b>	<b>PIC</b>	<b>EMR</b>	<b>MI</b>
UBC-808	11	10	90,91	0,30	9,091	2,69
UBC-810	11	11	100	0,30	11	3,31
UBC-811	8	8	100	0,28	8	2,27
UBC-812	12	12	100	0,39	12	4,64
UBC-823	9	9	100	0,28	9	2,52
UBC-825	6	6	100	0,37	6	2,22
UBC-826	13	13	100	0,32	13	4,20
UBC-828	4	4	100	0,36	4	1,43
UBC-834	12	12	100	0,30	12	3,60
UBC-835	7	7	100	0,31	7	2,17
UBC-836	11	11	100	0,35	11	3,90
UBC-840	6	6	100	0,31	6	1,88
UBC-841	9	9	100	0,26	9	2,37
UBC-842	8	8	100	0,35	8	2,77
UBC-846	2	2	100	0,35	2	0,69
UBC-847	2	2	100	0,20	2	0,40
UBC-848	5	5	100	0,29	5	1,43
UBC-850	7	7	100	0,28	7	1,98
UBC-852	7	7	100	0,32	7	2,22
UBC-855	6	6	100	0,33	6	1,98
UBC-856	12	12	100	0,30	12	3,65
UBC-857	13	13	100	0,26	13	3,41
UBC-866	5	5	100	0,38	5	1,88
UBC-889	13	13	100	0,30	13	3,95
Total	199	198				
Média				0,31	8,21	2,56

O primer UBC-808 foi o único que apresentou um locus monomórfico dos 11 gerados e apresentou 90,91% de polimorfismo. Resultado como este foi encontrado no trabalho de Souza et al. (2018), dos três *primers* utilizados, o primer UBC 842 foi o único com um locus polimórfico dos 29 gerados, apresentando 96,5% de polimorfismo.

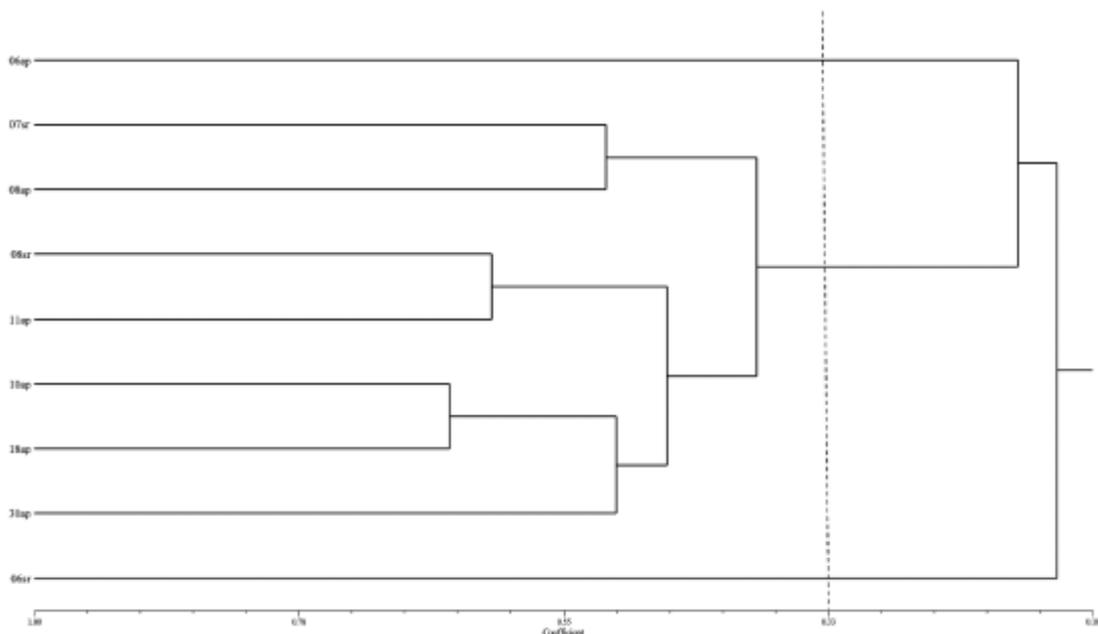
O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada primer variou entre 0,20 (UBC-847) a 0,39 (UBC-812). Os *primers* UBC-812, UBC-866, UBC-825 e UBC-828, apresentaram valores consideráveis (0,39, 0,38, 0,37 e 0,36, respectivamente) (Tabela 3), sendo indicados para futuras análises com o gênero.

Os parâmetros EMR e MI, são utilizados para demonstrar a qualidade e capacidade dos *primers* em gerar resultados relevantes. Portanto, no presente estudo, os valores de EMR e MI,

variaram de 2 (UBC-846) a 13 (UBC-826) e de 0,40 (UBC-847) a 4,64 (UBC-812), respectivamente.

Divakara et al. (2013), utilizaram em seus experimentos 19 *primers* ISSR, que produziram 209 bandas, entre elas as polimórficas, que variaram por *primer* com valores entre quatro e oito, mostrando assim a ampla diversidade genética as *Fusarium* spp. Estes mesmos autores afirmam ainda, que a identificação confiável e a caracterização genética de patógenos são necessárias para o manejo adequado de doenças de plantas, e que o método ISSR é uma técnica robusta, autêntica, confiável, e produz um nível mais alto de polimorfismo, quando comparados aos marcadores RAPD.

O dendrograma (Figura 6) mostra as relações genéticas do isolados de *Fusarium* spp., na qual foi identificado a formação de três grupos, considerando a distância média de 0,33 entre eles.



**Figura 5** – Dendrograma obtido pelo método UPGMA e complemento aritmético do índice de Jaccard como média de similaridade, entre os isolados de *Fusarium* spp., com base em 24 *primers* ISSR. Ponto de corte = 0,33%.

O grupo I foi composto por apenas um isolado, o 06sr, o grupo II foi formado por sete isolados, sendo eles: 30ap, 18ap, 10ap, 11ap, 08sr, 08ap e 7ap, o grupo III foi composto também por apenas um isolado, o 6ap. O grupo I e III apresentaram isolados com maior distância genética entre si, justamente por terem sido isolados de plantas diferentes e com origem geográfica distintas. O isolado 06sr tem origem de um acesso de mandioca brava do município

de Touros e o isolado 06-ap, tem origem de acesso de macaxeira do Assentamento São Romão, localizado no município de Mossoró.

O grupo II é composto por isolados provenientes de acessos pertencentes a dois municípios do Rio Grande do Norte, são eles: Bodó e Touros. Este agrupamento permite mostrar que há relação com a região geográfica da qual são provenientes, apresentando correlação entre variabilidade genética e origem geográfica dos isolados de *Fusarium* spp. Hamdi et al. (2019) ao realizar um estudo com cucurbitáceas, percebeu em suas investigações que, a análise com ISSR mostrou diferentes níveis de diversidade genética entre os isolados de *Fusarium* coletados em diferentes áreas geográficas, mostrando que isso pode ser atribuído a diferenças na frequência das sequências genômicas, sendo reflexo da diferença entre o tamanho do genoma e o de DNA repetido que foram investigados.

Observou-se pelo dendrograma formado através das análises com marcadores ISSR, que dentro do grupo II, há subdivisões entre os isolados, mostrando a aproximação de 10ap e 18ap, com uma média de similaridade de 0,6462, baseando-se em Jaccard. O coeficiente de Jaccard estimou valores de similaridade genética, que variaram entre 0,5135 e 0,6462. No grupo III, pode-se perceber que o isolado 06sr, apresentou maior distância genética, quando comparado aos demais isolados, com uma média baixa de similaridade, em torno de 0,1630, justificando assim, o fato do mesmo apresentar morfologicamente, uma coloração diferente de todos os outros isolados, possivelmente demonstrando ser uma espécie distinta, que só pode ser confirmada por meio de sequenciamento.

Os isolados 06sr, 07sr, 08sr pertencem a plantas de macaxeira de uma mesma localidade, porém morfologicamente e molecularmente comportaram-se de maneiras distintas, quando comparadas entre si. Portanto, o isolado 06sr, possivelmente venha a ser uma espécie de *Fusarium* diferente dos demais, por apresentar-se distinto em termos de coloração e distância genética, como já abordado anteriormente. Já os isolados 07sr e 08sr, apesar de terem sido isolados de plantas de macaxeira, apresentaram proximidade genética com os isolados de plantas de mandioca, mostrando assim uma afinidade morfológica e molecular entre eles.

Portanto o que poderia confirmar a conclusão destes agrupamentos seria o sequenciamento de regiões gênicas específicas destes isolados. Ao relacionar evolutivamente sequências parciais de DNA de um ou mais genes, as análises moleculares desempenham um papel crucial na identificação de novas espécies (BROWN; PROCTOR, 2013). Para identificação de espécies de *Fusarium*, diversas regiões do DNA podem ser amplificadas tais como: ITS (Internal Transcribed Spacer), beta-tubulina, fator de alongação 1 – alfa, entre outras (MACIEL, 2012). A sistemática molecular, fundamentada nas relações filogenéticas, é uma

ferramenta que proporciona uma segurança substancial na criação de um sistema complementar de classificação para fungos. Isso auxilia na definição de grupos taxonômicos e na designação mais precisa da posição desses microrganismos (ONO et al., 2010).

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que, os isolados avaliados apresentaram coloração diferentes. Dessa forma pode-se associar essa característica morfológica com a análise molecular para identificação de diversidade genética dentro dos isolados avaliados.

Em relação a caracterização morfológica, podemos perceber que os *primers* ISSR apresentaram eficácia em detectar polimorfismo nos isolados de *Fusarium* spp. Diante disso, é possível sugerir quais *primers* ISSR, dentre os que foram utilizados nesse estudo, para futuros estudos com o gênero.

Além disso, a caracterização molecular, permitiu uma compreensão do *Fusarium* spp., mostrando que os isolados mesmo pertencendo ao mesmo local de origem, ainda assim apresentaram características distintas, tanto morfológica, quanto molecular.

## REFERÊNCIAS

- APARECIDO, C. C.; ROSA, E. C. Avaliação morfológica e molecular para identificação de *Fusarium* sp. **Biológico**, São Paulo, v. 81, p. 1-7, 2019.
- ASHLEY JN, HOBBS BC, RAISTRICK H. Studies in the biochemistry of microorganisms: The crystalline coloring matter of *Fusarium culmorum* (WG Smith) Sacc. and related forms. **Biochemistry. J.** 31:385–397. 1937.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Detecção de *Fusarium subglutinans* em sementes de pinus. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico, 182).
- BAKER PM, ROBERTS JC. Studies in mycological chemistry. Part XXI. The structure of aurofusarin, a metabolite of some *Fusarium species*. **J. Chemical. Soc. C: Organization.** 2234–2237. 1966.
- BROWN, D. W.; PROCTOR R. A. *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology*. 1 ed. USA: **Caister Academic Press**, 2013, 194 p.
- BRUNS, T. D.; FOGEL, R.; TAYLOR, J. W. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. **Mycologia**, n. 2 v. 82, p. 175-184, 1990.
- BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Edinburg, v. 99, n. 1, p. 1-13, Jan, 1995.
- CAMBAZA E. Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds. **Foods.** Oct 5;7(10):165. 2018.
- CAMBAZA E., KOSEKI S., KAWAMURA S. The use of color as an alternative to size in *Fusarium graminearum* growth studies. **Foods.** 2018.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42, p. 225-226, 1939.
- CROPLIFE. Como o germoplasma contribuiu com a ciência e a segurança alimentar? Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/como-o-germoplasma-e-importante-para-a-ciencia-e-a-seguranca-alimentar-do-mundo/>. 2023.
- CROUS, P. W. et al. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. **Studies in mycology**, 98, 100116, 2021.
- DARYANTO, S. et al. Drought effects on root and tuber production: A meta-analysis. **Agricultural Water Management**, v. 176, p. 121-131, 2016.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton FL. Lewis Publishers. 1995.
- DIVAKARA et al. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. **J Sci Food Agric**, 2014, 94: 1132: 1139.

FÉLIX, João Paulo da Silva. **Inoculação de raízes destacadas de variedades de mandioca, com resposta diferencial de campo à podridão de raízes de *Fusarium solani***. Santarém – PA, 2018.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia**, 822 Lavras. V. 35, n. 6, 1039-1042p. 2014.

FU, T. P.; LIU, Z. H.; LI, Y. *Fusarium solani*: A New Pathogen Causing Postharvest Lemon Rot in Changchun, China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 8, p. 1548, 2017.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento**, ano III, 14, 12-16, 2000.

GUARRO, J. Fusarios, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2013, 32:1491-1500.

GUARRO, J.; GENÉ, J. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. **Mycoses**. v. 35, n. 5-6, p. 109-114, 1992.

GURJAR, G.; BARVE, M.; GIRI, A.; GUPTA, V. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. **Mycologia**, Lawrence, v.101, n.4, p. 480-491, 2009.

HAMDI et al. Genetic diversity of *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* the causal agente of crown and root roto f watermelon in Tunisia using ISSR markers. **Novel Research in Microbiology Journal**, 2019, 3(1): 271-280.

HOF, H. The Medical Relevance of *Fusarium* spp. **Journal Fungi**. 2020, 6, 117.

Classificação Taxonômica de *Fusarium* spp. Disponível em:  
<https://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=8284>.

JEEWON, R.; ITTOO, J.; MAHADEB, D.; FAKIM, Y. J.; WANG, H.-K.; LIU, A.-R. DNA based identification and phylogenetic characterisation of endophytic and saprobic Fungi from *Antidesma madagascariense*, a medicinal plant in mauritius. **Journal of Mycology**, New York, v. 2013, p. 1-10, 2013.

KIM H., SON H., LEE YW. Effects of light on the secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*. **J. Appl. Microbiol.** 116 :380–389. 2014.

Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing.

MA et al. Molecular Identification and Characterization of *Fusarium* Associated with Wanult Branch Blight Disease in China. **Pathogens**, 2023, 12, 970.

MACIEL, C.G. et al. *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* associated with damping-off in *Pinus* spp. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n.1, p2 134-141, 2017.

NELSON, P. E. et al. *Fusarium species, an Illustrated manual for identification*. 1 ed. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

NELSON, P. E. History of *Fusarium* systematics. **Phytopatology**. East Lansing, v.18, p. 1045-1048, 1991.

NUCCI et al. Invasive Fusariosis in Patients with Hematologic Diseases. **Journal Fungi**, 2021, 7, 815.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

OLIVEIRA, V. C. & COSTA, J. L. S. (2002). Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de f.

ONO, E. Y. S., et al. *Fusarium vertillioides* strains isolated from corn feed: characterization by fumonisin production and RAPD fingerprinting. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n.4, 2010.

PINHEIRO, M R. R. Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* com base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha de caju. 2004. 149 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.

RAMDIAL, H.; HOSEIN, F.; RAMPERSAD, S. N. First report of *Fusarium incarnatum* associated with fruit disease of bell peppers in Trinidad. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n.2, p. 526, 2016.

RAMPERSAD, S. N. Pathogenomics and Management of *Fusarium* Diseases in Plants. **Pathogens**, 2020, 9, 340.

SANTO S, T. M. D.; COSTA, M. R.; XAVIER, A. A.; NIETSCHE, S.; FERNANDES, T. P.; PEREIRA, G.V. N. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtidos de bananais do norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 437-445, 2011.

SAREMI, H., BURGESS, L. W. & BACKHOUSE, D. (1999). Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. **Soil**.

SILVA et al. Identification of pathogenic fungal isolates of the *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium fujikuroi* species complex, causing fusariosis in ornamental pineapple, and antifungal activity of elicitors. **Eur J Plant Pathol**, 2023, 165:125-137.

SMITH, N. C., HENNESSY, J. e STEAD, D. E. Repetitive Sequence-derived PCR Profiling Using the BOX-A1R Primer for Rapid Identification of the Plant Pathogen *Clavibacter michiganensis* Subspecies *Sepedonicus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 7, p. 739-748, 2001.

SUMMERELL B. A. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 44, n. 1, p. 3-13, 2010.

SUMMERELL, B. A. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. **Annual Review of Phytopathology**. 2019. 57:323-39.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v.87, n. 2, p. 117-128, 2003.

TAYLOR, A. et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing a vascular wilt of statice (*Limonium sinuatum*) in the UK. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n.6, p.1040-1040, 2017.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Sintomatologia, etiologia e manejo de doenças causadas por fungos e chormistas na cultura da batata. **O Biológico**, v. 84, 2022.

TOZZE JÚNIOR, H. J; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. Causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

VILAS BOAS, A. S. *et al.* Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v. 209, p. 237–251, 2016.