



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Botânica

**Quimeras periclinais em *Manihot*:
sua síntese, identificação e potencial econômico**

Nayra Nascimento Bomfim

**Brasília
2014**



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Botânica

Nayra Nascimento Bomfim

**Quimeras periclinais em *Manihot*:
sua síntese, identificação e potencial econômico**

Tese de doutorado submetida ao programa de pós-graduação em Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Nagib Mohammed Abdalla Nassar

Brasília
2014

Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1014749.

Bomfim, Nayra Nascimento.
B695q Quimeras periclinais em Manihot : sua síntese, identificação e potencial econômico / Nayra Nascimento Bomfim. -- 2014.
xi, 52 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2014.
Inclui bibliografia.
Orientação: Nagib Mohammed Abdalla Nassar.

1. Mandioca - Melhoramento genético. 2. Produtividade agrícola. 3. Raízes (Botânica). 4. Enxertia. 5. Epigenética.
I. Nassar, Nagib Mohammed Abdalla. II. Título.

CDU 631.52

Nayra Nascimento Bomfim

**Quimeras periclinais em *Manihot*:
sua síntese, identificação e potencial econômico**

Tese de doutorado aprovada pelo Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Botânica pela comissão julgadora composta pelos membros:

Data de aprovação: 21 de fevereiro de 2014

Nagib M. A. Nassar

Doutor em Genética

Professor emérito da Universidade de Brasília

Paulo Y. Kageyama

Doutor em Agronomia

Professor titular da Universidade de São Paulo

Magdi A. I. Aloufa

Doutor em Biologia e Fisiologia vegetal

Professor adjunto da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dalva G. Ribeiro

Doutora em Ciências Biológicas

Professora associada da Universidade Federal de Goiás

Paulo E. A. S. Câmara

Doutor em Sistemática Vegetal e Evolução

Professor Adjunto da Universidade de Brasília

Fernando P. Rodrigues

Doutor em Ciências Biológicas

Professor Adjunto da Universidade de Brasília

Dedicatória

Dedico às pessoas especiais na minha vida:
Francisca Tereza, minha mãe.
Nilton, meu pai.
Meu amado Renato.
Meus irmãos Naylton e Thalles.
Meus tios Paulo e Mana
e ao meu orientador Nagib.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive, pela proteção, e por me prover tudo o que era necessário para que eu pudesse alcançar estas realizações ao lado das pessoas que amo.

Agradeço ao Professor Nagib por todo apoio, persistência, ensinamentos e por me apresentar um tema para me apaixonar. Obrigada por ter me ajudado a ser uma pessoa muito melhor.

Agradeço à Capes e ao CNPq pelas bolsas de estudos e pelos recursos para os materiais e apresentações em congressos durante meu mestrado e doutorado.

Agradeço à professora Dalva G. Ribeiro por seu apoio e ensinamentos. Obrigada ter me apresentado uma ciência linda e esclarecedora que é a anatomia vegetal.

Agradeço ao Flávio Reis Rocha, ao José Martins e ao Alcirení pela essencial ajuda no campo. Muito obrigada! Estes resultados não seriam possíveis sem o seu trabalho.

Agradeço aos fortes e exemplares amigos Danielle Hashimoto Freitas e J. Moisés Mendoza, Pollyanna Gomes pela companhia, apoio moral e técnico. Obrigada por me darem força quando eu precisei.

Agradeço aos colegas Isabela Bonatto, Emanuel Magalhães, Raissa Melo, Naiane, Victor Marques, Bruno Milhomem e Lucas Teixeira e a toda equipe do Laboratório de Citogenética e Melhoramento da Mandioca, pela disponibilidade para ajudar, pelos apoios e alegrias de viver.

Agradeço à equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal da UnB, em especial à Jéssika Paula, Dayane, Nádia Somavilla, Sílvia Fernandes.

Agradeço aos professores Cristiane e Thomas pelo auxílio e material para quantificação de amido e aos técnicos do Laboratório de Bioquímica Vegetal da UnB.

Agradeço à Prof.^a Nair Bão, por ter cedido o laboratório para o estudo das epidermes e aos técnicos do Laboratório de Microscopia eletrônica da UnB pelo acompanhamento necessário.

Agradeço aos colegas do Programa de Pós-graduação em Botânica (alunos e funcionário) que me ensinaram diversas lições sobre a vida. A companhia de vocês foi essencial para a minha formação.

Obrigada aos Professores que se dispuseram a participar das minhas bancas de avaliação (projetos, qualificações e defesas finais de Mestrado e Doutorado) e por terem contribuído de maneira especial para o resultado deste trabalho.

Agradeço de maneira muito especial aos meus pais por sempre me incentivar e principalmente por sua perseverança. Muito obrigada por ser um grande exemplo de trabalho, persistência e competência. Agradeço imensamente à minha mãe Francisca Tereza por me sustentar, segurar pela mão e me dar a oportunidade de ter uma carreira acadêmica. Sou muito grata pela sua perseverança, paciência, sabedoria e força, principalmente nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu pai Nilton pelo seu esforço e vontade, em nos dar uma educação de qualidade para termos boas oportunidades.

Agradeço aos meus irmãos amigos Naylton e Thalles pela paciência, amor, carinho, e fé em mim. Obrigada por tanto amor e paciência, principalmente quando eu precisava.

Agradeço ao meu amado Renato pelo amor, carinho, segurança e paciência. Obrigada por me ajudar tanto. Sua segurança e paciência me mostraram que posso ir mais longe do que eu esperava.

Agradeço os meus tios pelo carinho, exemplo, incentivo e patrocínio financeiro, especialmente aos tios Paulo e Francisca, Maria do Carmo (Mana) e Isabel e Ana Cláudia. Obrigada por vocês serem tão especiais. Obrigada aos Tios Robison (Dida), Marco, Iran, Betinha, Tavinho, Bago e aos tios falecidos por ter torcido por mim: Tio João, Tio Júnior, Tio Dominginhos, Tio Tião e Tia Denise.

Agradeço aos primos e amigos pelo carinho e fé, especialmente a Waleska (*in memoriam*), Oslohn, Alessandra, Isaac, Polyana, Vinícius, Renato, Gabriel, Vanessa, Gabriela, Camila, Marina, Maryane, Rafael, Ícaro, Alexandre, Herleane, Herlaine, Inara.

Agradeço também a todos os amigos que torcem e oram por mim. Obrigada, sua ajuda foi especialmente valiosa.

Que Deus abençoe ricamente a todos!

Quimeras periclinais em *Manihot*: sua síntese, identificação e potencial econômico

(Bomfim, N.N, Doutorado em Botânica)

Resumo

As quimeras são um tipo específico de mosaico, onde tecidos de diferentes espécies coexistem no meristema apical de uma mesma planta. Este fenômeno tem o potencial de produzir novos caracteres e por isso despertou o interesse de cientistas sobre a potencialidade de ser utilizado como método de melhoramento de plantas para formação de novas variedades. Entretanto quimeras, produzidas artificialmente, que agreguem valor econômico às espécies cultivadas ainda não foram alcançadas. Este trabalho teve o intuito de sintetizar uma quimera entre mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e *M. fortalezensis* Nassar, que combinasse características de ambas as espécies. Para isso, foram induzidos brotos quimerais a partir da enxertia seguida de tratamento com hormônios, o que resultou em duas quimeras. Para caracterização diagnóstica utilizou-se os marcadores: presença de asas nos frutos (típico da espécie cultivada); e número cromossômico, de células-mãe do pólen e de células somáticas de pontas de raízes adventícias, uma vez que as espécies parentais têm diferentes ploidias. Ambas as quimeras apresentaram asas proeminentes nos frutos e uniformidade de características na planta, o que evidencia uma epiderme inteiramente constituída por *M. esculenta* (E). A avaliação citogenética das células mãe do pólen e das células somáticas na ponta de raiz, mostraram ter número cromossômico idênticos ao de *M. fortalezensis* (F), i.e. $2n=54$, o que evidencia que os tecidos internos são constituídos por *M. fortalezensis*. Portanto, ambas as quimeras foram identificadas como EFF (referente à identificação dos histógenos L1, L2 e L3) com um arranjo periclinal. A primeira quimera tem epiderme constituída pela variedade de mandioca UnB 201 e produziu raízes tuberosas longas e cilíndricas, pesando 10-12 Kg por planta. A segunda quimera tem a epiderme constituída pela variedade UnB 032 e produziu raízes tuberosas longas e cilíndricas que pesavam 14 Kg por planta. Enquanto as variedades parentais UnB 201 e UnB 032 produziram raízes com 2-3 Kg por planta, com a mesma idade. Estes resultados demonstraram ser possível combinar as raízes tuberosas da mandioca ao vigor da espécie silvestre em uma quimera. O novo fenótipo apresentado pelas quimeras (raízes tuberosas maiores que ambos os parentais) provavelmente é devido à interação epigenética entre as duas espécies. Este fenótipo mostrou ser possível combinar diferentes espécies em uma quimera e um grande potencial de produzir variabilidade vantajosa especialmente para a cultura da mandioca. Adicionalmente, foi feita avaliação anatômica das raízes e da epiderme da segunda quimera para verificar sua constituição tuberosa e confirmar a identificação da epiderme. As raízes apresentaram constituição tuberosa rica em grãos de amido, de formato e distribuição similares aos encontrados na mandioca variedade UnB 032 e a epiderme apresentou características específicas da mandioca variedade UnB 032 (tricomas e células epidérmicas comuns de formato regular) e atributos quantitativos (largura das células comuns, frequência de tricomas e comprimento de estômatos) de medidas intermediárias às encontradas nos parentais, o que evidenciou a interação entre os tecidos das duas espécies na quimera.

Palavras-chave: Mandioca. Produtividade. Raízes. *M. fortalezensis*. Enxertia. Interação epigenética.

Periclinal chimeras in *Manihot*: Synthesis, identification and economic potential

(Bomfim, N. N., PhD in Botany)

Abstract

Chimeras are a specific kind of mosaics where tissues from different species coexist in the apical meristem of the same plant. Such phenomenon has the potential to generate new characters and therefore called researchers's attention to the potentiality to be used as a plant breeding method to produce new varieties. However, artificially synthesized chimeras which aggregate economic value to cultivated species have not been reached yet. This work aimed to synthesize a chimera between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. fortalezensis* Nassar, which combines traits from both species. Therefore, chimeral shoots were induced by graft followed by hormone treatment that resulted in two chimeras. For the diagnostic characterization these markers were used: fruit wings (typical of cultivated species), and chromosomal number, in pollen mother cells and somatic cells from adventitious root tips, since parental species had different ploidy level. Both chimeras showed prominently fruit wings and traits's uniformity, that evidenced an epidermis wholly constituted by *M. esculenta* (E). The cytogenetic analysis of pollen mother cells and somatic cells from root tips showed chromosomal number identical to *M. fortalezensis* (F), i. e. $2n=54$, which evidence that inner tissues are constituted by *M. fortalezensis*. Therefore, both chimeras were identified as EFF (referring to L1, L2, L3) with periclinal arrangement. The first chimera has epidermis constituted by cassava variety UnB 201 and yielded cylindrical and long tuberous roots, weighting 10-12 Kg per plant. The second chimera has epidermis constituted by cassava variety UnB 032, and yielded cylindrical and long tuberous roots weighting 14 Kg per plant. While parental varieties UnB 201 and UnB 032 yielded 2-3 Kg of root per plant, at the same age. These results demonstrated that cassava tuberous roots could be combined to the wild vigor in a chimera. The new chimeral phenotype (tuberous roots greater and heavier than parental species) it is probably due to the epigenetic interaction between both species. This phenotype showed to be possible to combine different species in a chimera and a great potential to generate advantageous variability, specially to cassava crop. Additionally, it was realized a root and epidermal anatomical analysis of the second chimera to verify tuberous constitution and to confirm epidermal identification. Roots showed tuberous constitution rich in starch grains with shape and distribution similar to such find in cassava UnB 032 and epidermis with specific traits of cassava variety UnB 032 (trichomes and ordinary epidermal cells of regular shape) and quantitative characters (trichome frequency, stomatal length and ordinary cell width) expressing intermediate measurements when compared to parents, what evidenced interaction between both species's tissue in the chimera.

Key-words: Cassava. Productivity. Root, *M. fortalezensis*, Graft, Epigenetic interaction.

Lista de Ilustrações

- Figura 1** Diagrama explicando o método de produção de quimeras por enxertia—Método de Winkler. A: Parte superior do enxerto (cavaleiro) formada por *S. nigrum* está enxertada sobre a parte inferior do enxerto (cavalo) constituída por tomate. B: Após a união, a junção é cortada transversalmente. C: Um broto quimeral é produzido da junção. (Fonte: Liu, 2006). 3
- Figura 2** Meristema apical caulinar em vista longitudinal e as camadas distinguíveis devido ao sentido de divisão celular: L1 e L2 divisão periclinal e L3 divisão anticlinal e periclinal. L1: a mais externa dá origem à epiderme; L2, a camada subjacente dá origem aos gametas e tecidos subepidermes e L3 dá origem aos tecidos internos (vasculares e medula). 4
- Figura 3** Classificação das quimeras segundo o arranjo histológico dos tecidos genotipicamente diferentes no meristema apical caulinar em vista transversal. Periclinal: 1 ou 2 camadas inteiras são constituídas por um genótipo diferente das demais. Mericlinal, apenas parte de 1 ou 2 camadas é diferente das demais; e Setorial apenas parte de todas as camadas (i.e. um setor) é genotipicamente diferente do setor adjacente. 5
- Figura 4** Características morfológicas da Quimera (EFF) comparada aos parentais. A: Folhas: *M. fortalezensis* (esquerda), Quimera (centro), variedade de mandioca (direita). B.: Frutos: *M. fortalezensis* (esquerda), quimera (centro), variedade de mandioca UnB 201 (direita). Barra= 10 cm. 18
- Figura 5** Metáfase meiótica I mostrando número cromossômico. A. *Manihot fortalezensis* (FFF), $2n=54$, 23 bivalentes (20 em azul e 3 pares recentemente separados: 2 em verde e 1 em amarelo). B.: Quimera de mandioca (EFF), $2n=54$, 17 bivalentes (16 em azul e 1 recentemente separado em amarelo), 17 univalentes (vermelho), 1 trivalente (azul). 20
- Figura 6** Crescimento vigoroso da Quimera (EFF) comparado ao do parental *M. esculenta* Variedade UnB 201. A. Quimera.; B. Mandioca variedade UnB 201. 21
- Figura 7** Formação da quimera a partir da enxertia. Esquema representando os passos para formação e estabelecimento do experimento 26
- Figura 8** Planta inteira e raízes da Quimera 3 (centro) comparada às espécies parentais *M. fortalezensis* (esq) e *M. esculenta* da variedade UnB 032 (dir.): A: Arbusto ereto normalmente solitário, ca. 8m. B. Quimera 3: Arbusto semiereto ca. 4m, com ramificação. C. UnB 032: Arbusto ereto com ramificação ca. 2m. 30
- Figura 9** Características anatômicas da Quimera 3 comparada às espécies parentais: *Manihot fortalezensis* e *M. esculenta* variedade UnB 032. A, B, C: Meristema apical caulinar. Nenhuma diferença de tamanho entre camadas e tamanho semelhante ao de *M. fortalezensis*. D, E, F: Vista paradérmica da lamina foliar, formato das células da Quimera 3 semelhantes à UnB 032. Estômatos de tamanho intermediário aos dos parentais. G, H, I: Tricomas sobre as nervuras centrais. Quimera 3 apresenta tricomas assim como na UnB 032. J, K, L: Vista transversal do pecíolo. Células epidérmicas comuns de largura intermediária à dos parentais, todos possuem cutícula espessa. 32
- Figura 10** Número cromossômico na Quimera 3 (centro) comparado às espécies parentais *Manihot fortalezensis* (esquerda) e *M. esculenta* (direita), ao lado dos respectivos croquis. A, B, C: Metáfase I em células mãe do polen (derivadas da camada L2); D.: Metáfase em célula meristemática da ponta de raiz (derivada da camada L3). Marcas azuis: bivalentes; pretas e vermelhas: univalentes. Barra: 20 μ m. 34

Lista de Tabelas

- Tabela 1** Características morfológicas das plantas quimerais (EFF) e seus parentais, *Manihot fortalezensis* e a variedade de mandioca UnB 201..... 19
- Tabela 2** Caracterização morfológica da Quimera 3 comparada às espécies parentais *Manihot fortalezensis* e *M. esculenta* da variedade UnB 032..... 28
- Tabela 3** Diâmetro dos grãos de amido da Quimera 3 comparada à variedade de mandioca UnB 032. Média seguida de desvio padrão , diâmetros mínimos e máximos. 30
- Tabela 4** Caracterização da epiderme foliar (limbo e pecíolo) da Quimera 3 comparada às espécies parentais: *Manihot fortalezensis* e *M. esculenta* (variedade UnB 032), no 6º nó (comprimento do estômato, n=5; largura das células do pecíolo: n=4). 33

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo 1: Revisão de Literatura.....	3
Quimeras em espécies cultivadas.....	3
Melhoramento vegetal utilizando-se síntese de quimeras.....	6
A Mandioca.....	8
Aspectos taxonômicos e ecológicos.....	8
Importância e Usos.....	8
Melhoramento da mandioca.....	9
Objetivos.....	10
Objetivo geral.....	10
Objetivos específicos.....	10
Referências.....	11
Capítulo 2: Primeiro artigo.....	15
Síntese de quimera periclinal em mandioca.....	15
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	16
Resultados.....	17
Discussão.....	21
Agradecimentos.....	22
Referências.....	22
Capítulo 3: Segundo artigo.....	24
A utilização de quimeras periclinais como método de melhoramento pode impulsionar a produção de raízes tuberosas em mandioca.....	24
Introdução.....	24
Material e métodos.....	25
Resultados e Discussão.....	28
Conclusão.....	35
Agradecimentos.....	35
Referências.....	35
Considerações finais.....	38

INTRODUÇÃO

As quimeras vegetais são mosaicos nos quais células genotipicamente diferentes coexistem no meristema apical caulinar, o qual origina as células que se diferenciam nos órgãos maduros. Quando o arranjo dessas células, no meristema apical caulinar, é concêntrico, ela é dita periclinal. (Marcotrigiano 1997a; Burge et al. 2002; Chen et al. 2006). Nessas quimeras os órgãos - e.g. epiderme, gametas e tecidos vasculares- são constituídos por tecidos genotipicamente diferentes, o que resulta em novos fenótipos, isto é, com morfologia diferente da apresentada pelos parentais que são genotipicamente homogêneos (Stewart et al. 1972; Zhou et al. 2002; Wang et al. 2010).

Estes organismos têm grande importância para os estudos de ontogênese, uma vez que a destinação das células meristemáticas é dependente da localização que ela ocupa no ápice caulinar (Satina et al. 1940; Stewart et al. 1970; Evert 2006), e sua grande aplicação é a possibilidade de combinação de características de diferentes espécies, o que tem o potencial de originar novas variedades de plantas cultivadas, e assim, se constitui uma importante ferramenta para o melhoramento (Marcotrigiano, Gradziel 1997; Burge et al. 2002; Nassar, Ortiz 2010).

Algumas tentativas de combinar características vantajosas resultaram em exemplos bem sucedidos: em *Solanum lycopersicum* L. obteve-se uma quimera resistente aos afídeos transmissores de viroses devido a epiderme de *S. penelli* (Goffreda et al. 1990); e em citrus foi possível combinar o aroma e a cor do fruto de *Citrus sinensis* L. e *Citrus unshiu* Marc. L. (Zhang et al. 2007). Já em *Camellia japonica* L. flores atrativas e com órgãos reprodutivos restaurados foi obtida em uma quimera com epiderme de *Camellia sasanqua* Thunb. (Stewart et al. 1972). Estes exemplos foram obtidos, induzidos ou espontaneamente, a partir da enxertia entre duas espécies e se mostraram promissores em combinar e originar características dificilmente conseguidas por meios tradicionais como a hibridação.

Por isso, a síntese de quimeras tem sido sugerida como um método capaz de superar dificuldades de combinação de diferentes espécies seja por causa da esterilidade ou dificuldade de propagação do novo genótipo produzido. Como é o caso de espécies de *Manihot*, onde há genótipos interessantes que por serem triploides não geram sementes para hibridação, ou ainda porque mesmo híbridos férteis produzem poucas sementes, o que dificulta a avaliação de fenótipos interessantes. A mandioca, *M. esculenta* Crantz, é uma espécie que tem a possibilidade de agregar importantes características de espécies silvestres do gênero através deste método, e por ser propagada essencialmente de maneira vegetativa, teria seu uso viável e a propagação da quimera assegurada. Isso porque a estrutura quimeral só pode ser propagadas vegetativamente.

A síntese de quimeras também oferece a possibilidade de ampliar as fontes de variabilidade para o melhoramento, uma vez que espécies propagadas vegetativamente são melhoradas principalmente a partir da seleção clonal e intervarietal, o que é limitado em termos de variabilidade genética e fenotípica, quando comparado à hibridização interespecífica (Jennings, Iglesias 2002; Ceballos et al. 2004; Nassar, Ortiz 2009). Esta, apesar de haver contribuído intensamente para o cultivo da cultura em áreas assoladas por bacteriose e viroses, é difícil devido às barreiras entre espécies, e à necessidade de diversos retro cruzamentos - para eliminar características silvestres indesejáveis e restaurar os caracteres desejáveis (Rieseberg, Carney 1998; Nassar, Ortiz 2009;

Ulukan 2009; Ceballos et al. 2012) - ao passo que a formação de quimeras oferece a possibilidade de produção de variedades que combinem diferentes espécies, sem estas dificuldades e ainda de maneira única.

Este estudo teve a finalidade de sintetizar uma quimera periclinal no gênero *Manihot* que combinasse uma espécie silvestre à espécie cultivada *M. esculenta*, a fim de se obter uma variedade da mandioca. Nele inclui-se caracterização morfológica, anatômica e citogenética de duas espécies, bem como de duas quimeras, para a identificação e avaliação do potencial de produção das quimeras sintetizadas.

Este texto foi organizado em três partes: no primeiro capítulo consta uma breve revisão bibliográfica, o segundo capítulo se refere ao primeiro artigo publicado, onde relata-se a primeira quimera induzida artificialmente; e no terceiro capítulo consta o segundo artigo onde é descrita a segunda quimera obtida pelo grupo de trabalho ao qual faço parte.

Capítulo 1: Revisão de Literatura

Quimeras em espécies cultivadas

A palavra quimera veio da mitologia grega e designa a figura mitológica caracterizada pela aparência de dois animais e, em plantas, este termo é utilizado para designar um organismo mosaico constituído por células geneticamente diferentes no meristema apical caulinar (Marcotrigiano 1997).

O primeiro relato formal desse fenômeno ocorreu em uma planta constituída por tomate (*Solanum lycopersicum*) e *S. nigrum* L., a partir da enxertia entre as duas espécies e surgimento espontâneo de um broto na região de junção entre enxertos (Winkler 1907 apud Liu 2006). Esta quimera apresentava frutos de *S. lycopersicum* e frutos de *S. nigrum* na mesma planta, em regiões longitudinalmente adjacentes (Figura 1C). Depois deste experimento, diversas outras iniciativas de induzir a formação de quimeras entre diferentes espécies foram relatadas (Marcotrigiano, Gradziel 1997; Burge et al. 2002). Algumas, surgiram espontaneamente a partir da enxertia, ou foram induzidas por tratamento com auxinas sintéticas, outras ainda foram produzidas in vitro, a partir da cultura de calos mistos, co-cultura de protoplasto e microenxertia (Zhang et al. 2007; Kaddoura, Mantell 1984; Chen et al. 2006).



Figura 1 Diagrama explicando o método de produção de quimeras por enxertia—Método de Winkler. A: Parte superior do enxerto (cavaleiro) formada por *S. nigrum* está enxertada sobre a parte inferior do enxerto (cavalo) constituída por tomate. B: Após a união, a junção é cortada transversalmente. C: Um broto quimeral é produzido da junção. (Fonte: Liu, 2006).

Quimeras em um sentido estrito é um organismo mosaico constituído por células genotipicamente diferentes coexistindo no meristema apical caulinar, o qual origina as células que se diferenciarão para formar os órgãos na planta madura. Esta determinação das células depende da localização que elas ocupam no meristema apical (Satina et al. 1940; Stewart et al. 1970; Evert 2006), a camada mais externa dá origem às células diferenciadas da epiderme, é denominada dermatógeno, mas comumente referida apenas por L1 (Layer 1). A segunda camada (L2) é o periblema, dá origem aos gametas e aos tecidos subepidérmicos (e.g. córtex parenquimático), enquanto a camada mais interna (L3) é o pleroma e dá origem aos tecidos vasculares e medula (Figura 2). Desta forma, é possível deduzir a origem dos tecidos com base no fenótipo dos órgãos,

uma vez que o destino celular é determinado pela posição da célula nas camadas meristemáticas apicais (Stewart et al. 1972; Goffreda et al. 1990; Kaddoura, Mantell 1984).

Na maioria das dicotiledôneas, é possível distinguir as duas camadas mais externas devido o sentido da divisão celular ser predominantemente anticlinal, o que permite cada camada manter um crescimento independente (Stewart et al. 1970; Schmidt, 1924 apud Evert 2006). Esta região é denominada Túnica. Enquanto as demais camadas internas se dividem nos dois sentidos, anticlinal e periclinal, sendo denominadas Corpo (Schmidt, 1924 apud Evert, 2005).

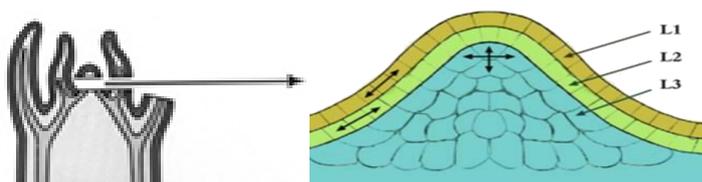


Figura 2 Meristema apical caulinar em vista longitudinal e as camadas distinguíveis devido ao sentido de divisão celular: L1 e L2 divisão periclinal e L3 divisão anticlinal e periclinal. L1: a mais externa dá origem à epiderme; L2, a camada subjacente dá origem aos gametas e tecidos subepidermes e L3 dá origem aos tecidos internos (vasculares e medula).

A notação que representa a constituição das quimeras sempre diz respeito à constituição das camadas meristemáticas apicais, e segue a notação de letras maiúsculas (e.g., uma quimera com epiderme de *Solanum lycopersicum* (L) e tecidos internos de *S. nigrum* (N), é representada por LNN, referente à L1, L2, L3. Os organismos não quimeras seriam representados pela mesma letra, e.g. LLL, uma vez que apresentam o mesmo genótipo nas três camadas. Considerando a determinação das células, a identificação do genótipo (ou espécie) de cada camada é feita com base no fenótipo dos órgãos. Caracteres como pubescência, tamanho e densidade estomática, cor e tamanho das células epidérmicas permitem deduzir a constituição da camada L1 (Stewart et al. 1972; Goffreda et al. 1990; Kaddoura Mantell 1984; Zhang et al. 2007; Marcotrigiano 2010). Enquanto, polens derivados da camada L2, características florais e formato de folhas auxiliam a identificação da camada L2 (Satina et al. 1940; Kaddoura Mantell 1984). Já, o número cromossômico em pontas de raízes, hábito de crescimento e forma de inflorescência permitem reconhecer a constituição da camada L3 (Stewart et al. 1972; Kaddoura Mantell 1984). Adicionalmente, a avaliação histológica direta dos ápices caulinares ajuda a identificação dos genótipos quando os diferentes genótipos apresentam níveis de ploidias muito diferentes, i.e diferença maior $2n$ (Satina et al. 1940; Stewart et al. 1972).

A ocorrência de células genotipicamente diferentes no organismo tem gerado novos fenótipos (Stewart et al. 1972; Zhou et al. 2002; Wang et al. 2010; Zhang et al. 2007). O arranjo que elas assumem resulta em formas variadas - de folhas, flores, epiderme e até o hábito- na planta madura de acordo com a extensão e o arranjo que os diferentes tecidos ocorrem no meristema apical. Este arranjo é classificado em setorial, mericlinal ou periclinal (Figura 3), e que tem importância devido à implicação na estabilidade histológica no indivíduo adulto e conseqüentemente na propagação vegetativa da quimera (Marcotrigiano, Gradziel 1997). As quimeras periclinais são as mais estáveis histologicamente, porque os tecidos genotipicamente diferentes estão organizados concêntricamente, o que significa que um dos genótipos constitui uma camada meristemática completa. Enquanto os

outros tipos de quimeras - mericlinal e setorial - apresentam camadas incompletas e se diferem devido a extensão - o tipo setorial se estende por todas as três camadas, e o mericlinal apenas por parte de uma ou duas camadas. A instabilidade histológica se deve às diferenças na velocidade de crescimento dos diferentes tecidos, o que resulta no desaparecimento de um deles com o crescimento da planta (Marcotrigiano, Gradziel 1997; Burge et al. 2002).

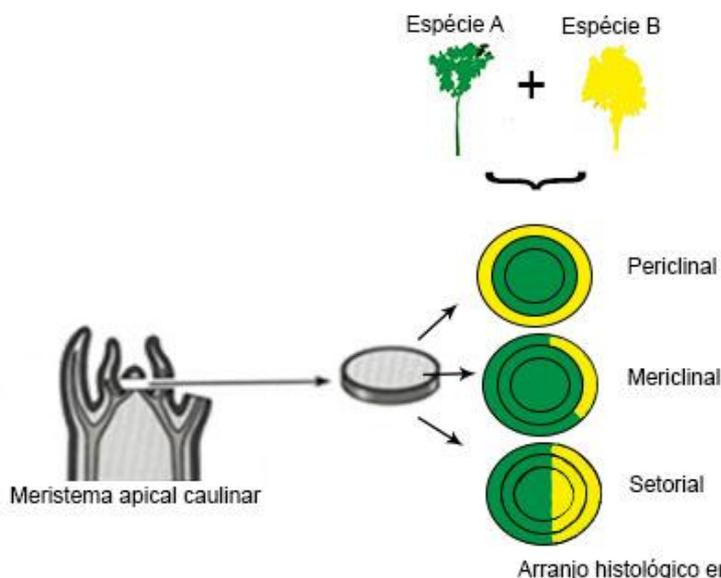


Figura 3 Classificação das quimeras segundo o arranjo histológico dos tecidos genotipicamente diferentes no meristema apical caulinar em vista transversal. Periclinal: 1 ou 2 camadas inteiras são constituídas por um genótipo diferente das demais. Mericlinal, apenas parte de 1 ou 2 camadas é diferente das demais; e Setorial apenas parte de todas as camadas (i.e. um setor) é genotipicamente diferente do setor adjacente.

A formação de quimeras periclinais se dá a partir de quimeras setoriais ou mericlinais. Isto é, células de uma determinada camada se deslocam e substituem células da camada meristemática adjacente (Marcotrigiano; Gouin 1984; Kaddoura, Mantell 1984; Burge et al. 2002). Isso acontece por causa da competição dos tipos celulares no meristema apical, devido à divisão mais rápida de um dos genótipos e substituição de uma célula na camada adjacente, que por sua vez se dividirá anticlinalmente compondo a nova camada.

A ocorrência de novos fenótipos em quimeras demonstraram que diferentes espécies podem ser combinadas em um único organismo (Winkler, 1907 apud Liu 2006; Stewart et al. 1972; Kaddoura Mantell 1984; Hirata et al. 2000; Wang et al. 2010; Zhang et al. 2007). Isso, chamou a atenção para a potencialidade de formação de novos caracteres e de utilização da enxertia para formação de novas quimeras como métodos de melhoramento.

Melhoramento vegetal utilizando-se síntese de quimeras

Diversas iniciativas de produção de quimeras interespecíficas constituídas por espécies cultivadas são relatadas (Kaddoura, Mantell 1984; Marcotrigiano, Gouin 1984; Goffreda et al. 1990; Hirata et al. 1990; Burge et al. 2002; Chen et al. 2006; Zhu et al. 2007; Wang et al. 2010), sendo a grande maioria em membros das famílias *Solanaceae* e *Brassicaceae*, as quais são principalmente herbáceas e por isso com uma maior facilidade de gerar brotos a partir de tecidos diferenciados. A maioria das espécies propagadas vegetativamente são lenhosas ou semi-lenhosas, por exemplo citros, mandioca, maçã, uva, o que dificulta a formação de brotos a partir de tecidos diferenciados em órgãos maduros devido ao alto grau de lignificação. Logo, há poucas quimeras sintetizadas e raros relatos de cultivo de variedades quimerais até então. Nas últimas revisões publicadas (Marcotrigiano, Gradziel 1997; Burge et al. 2002) a respeito do potencial de utilização no melhoramento, não há relatos de quimeras que estejam sendo amplamente cultivadas. Os relatos tem um enfoque investigativo, de valiosa importância para os estudos de ontogênese e de transferência genética horizontal (Szymkowiak, Sussex 1996; Marcotrigiano, Gradziel 1997; Stegemann, Bock 2009; Marcotrigiano 2010), mas que não se referem ao potencial de cultivo e de melhoria de alguma característica em uma espécie cultivada.

Embora não haja variedades quimerais artificialmente sintetizadas e cultivadas, a síntese de quimeras demonstrou um grande potencial de formação de variedades únicas, havendo inclusive exemplos especiais em espécies ornamentais, frutíferas e hortícolas. Por exemplo entre a espécie *Camellia sasanqua* Thunb. e *Camellia japonica* L., uma quimera periclinal produziu flores com tamanho e formato diferentes dos parentais (Stewart et al. 1972). Enquanto em espécies frutíferas, há relato da ocorrência de sabor misto, fruto de cor e tamanho distinto das espécies parentais *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Citrus unshiu* Marc. (Zhang et al. 2007). Outro exemplo é a quimera de com *L. esculentum* Mill. e *Lycopersicon pennellii* (Correll) D'Arcy, resistente ao afídeo transmissor de viroses, devido a presença da epiderme da espécie silvestre *L. pennellii*, que apresenta tricomas glandulares produtores de triacilglucoses, que reduzem a colonização dos afídeos (Goffreda et al. 1990).

A dificuldade de formação de variedades quimerais interespecíficas é devido a necessidade de (i) trabalho manual qualificado para fazer enxertia (Pina; Errea 2005; Mudge et al., 2009), (ii) ao relativo alto grau de lignificação dos tecidos adultos em espécies de propagação vegetativa (Pina, Errea 2005), (iii) ao conhecimento incipiente de espécies silvestres úteis com características que contribuam para a espécie cultivada (Nassar 1978; Allem 2002; Ulukan 2009; Nassar et al. 2008), e (iv) à frequente baixa eficiência de formação de brotos quimerais (Burge et al. 2002), possivelmente por inadequação do método.

A enxertia é uma técnica horticultural relativamente laboriosa e que exige domínio para se ter uma alta eficiência da junção entre os enxertos. Além disso, características histológicas e bioquímicas da espécie devem ser levadas em conta, pois muitas vezes impedem a junção entre os enxertos (Pina; Errea 2005). Algumas espécies tem mais afinidade entre si (Nassar, 1980; Pina, Errea 2005),

enquanto outras morrem ao ser enxertadas por incompatibilidade dos tecidos ou ainda à presença de substâncias tóxicas como os glicosídeos cianogênicos presentes na mandioca.

O grau de lignificação dos tecidos influi na capacidade de formação de calo na região de fusão entre os enxertos e também na formação de brotos nas secções transversais. A maioria dos relatos de quimeras sintetizadas foram obtidas em plantas herbáceas (Kaddoura, Mantell 1984; Zhu et al. 2007; Chen et al. 2006; Marcotrigiano, Gouin 1984; Hirata et al. 1990; Wang et al. 2010), em geral constituídas por tecidos mais tenros compostos por células parenquimáticas, as quais voltam à condição meristemática mais facilmente e por isso formam calos com maior facilidade do que tecidos mais lignificados. A formação de calo na região de junção dos enxertos é essencial para a fusão da parte superior à parte inferior do enxerto; e a brotação na região exposta de união dos enxertos é imprescindível para o surgimento da quimera. Boa parte das espécies propagadas vegetativamente são lenhosas ou semi-lenhosas.

As espécies silvestres têm sido citadas como uma grande fonte de variabilidade e de genes úteis para o melhoramento de espécies cultivadas. Contudo, o melhoramento de espécies cultivadas propagadas vegetativamente se concentra em seleção clonal e não há ainda um olhar atento para a manutenção, caracterização e seleção de espécies silvestres em diversas culturas. Apesar dos valiosos exemplos da contribuição das espécies silvestres às espécies cultivadas para segurança alimentar (Carvalho et al. 1995; Allem 1999; Jennings, Iglesias 2002; IDRC 2010; Nassar; Ortiz 2010). A importância desta fonte de variabilidade é ainda muito negligenciada.

A baixa eficiência de formação de brotos quimerais se deve em parte às técnicas utilizadas para a indução de brotos em secções expostas do caule constituído por tecido de dois enxertos (Burge et al. 2002), essa condição não favorece o surgimento de brotos quimerais em campo a céu aberto, enquanto a cultura de tecidos *in vitro* fornece condições controladas que aumentariam a eficiência de brotação. No entanto o desenvolvimento de protocolos adequados para espécies silvestres ainda é incipiente (Pence, Engelmann 2011).

Os diversos exemplos despertaram para a valiosa contribuição que a síntese de quimeras oferece para produção de variedades vantajosas. Em alguns casos, o modo de propagação das espécies não viabilizava a utilização da quimera em grandes escalas (Goffreda et al. 1990; Chen et al. 2006), pois a estrutura quimeral requer ser propagada vegetativamente e não pode ser replicada por sementes (Kaddoura Mantell 1984; Goffreda et al. 1990).

Espécies cultivadas onde a propagação é feita por órgãos vegetativos, como a mandioca, são excelentes candidatas para serem combinadas à espécies silvestres em uma quimera. A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, é uma cultura que pode obter boas vantagens com uma quimera interespecífica, por ter espécies silvestres úteis disponíveis e com alta afinidade de formação de enxertos com a espécie cultivada (Nassar, 1980; Pellet, El-Sharkawy, 1994; Nassar et al. 2008).

A Mandioca

Aspectos taxonômicos e ecológicos

A mandioca pertence a família Euphorbiaceae, e é a única espécie cultivada do gênero *Manihot*, que possui cerca de 100 espécies (Rogers, Appan 1973; Nassar 1985; Nassar et al. 2010). Todas estas espécies são nativas da América, com distribuição natural no continente entre os paralelos 30° Norte e 30° Sul, isto é, entre o sul do Arizona nos Estados Unidos e o centro da Argentina (Rogers, Appan 1973).

Dentre estas espécies, cerca de 80 são nativas do Brasil, e ocorrem principalmente em Goiás, Minas Gerais e Bahia, onde o hábitat é especialmente xeromórfico; apesar de também ocorrerem em florestas úmidas na Amazônia (Rogers, Appan, 1973; VMA-Biodiversity, 2010). Em geral, as espécies são heliófitas e capazes de ocupar áreas abertas.

A espécie *M. esculenta* não é um táxon monofilético (Chacón et al. 2008), e sob ele são conhecidas mais de cem cultivares (Faraldo et al. 2000).

Importância e Usos

A mandioca, é a 5ª maior fonte de energia nas dietas humanas (FAO 2013). Ela é base alimentar para pelo menos 800 milhões de pessoas (FAO 2013). Além disso, ela se destaca de outras culturas por tolerar o cultivo com poucos insumos, solos pobres e pluviosidade baixa ou imprevisível (FAO 2013). Ela também é uma das poucas culturas que podem ser produzidas eficientemente em pequena escala e ser propagada facilmente por estaquia, o que tem baixo custo e a anualmente, após a colheita, fica prontamente disponível (FAO 2013). Além disso, a possibilidade de um longo período de colheita no campo por períodos de 8 meses a 2 anos, asseguram a disponibilidade e facilitam a colheita. Estes motivos a fazem uma das culturas de segurança alimentar mais confiáveis e por isso amplamente cultivada no mundo, e principalmente no Brasil, África e Ásia (Nassar, Ortiz 2010; FAO, 2013). O principal produto da planta de mandioca são as raízes tuberosas que podem ser consumidas *in natura* cozidas ou em forma de farinha, mas toda a parte aérea é utilizada para alimentação animal ou adubação. As raízes apresentam alto teor de amido, que varia entre 20 e 40% (Lorenzi 1978; Lindeboom et al. 2004) e é reconhecido como uma fonte pura de amido para uma vasta gama de aplicações alimentícias e industriais: polvilho, rações, remédios, adesivo, papel, cosméticos, bioetanol, materiais sintéticos, têxteis e fotográficos (Lindeboom et al. 2004; Adejumo et al. 2011).

A mandioca é diferente de seus parentes silvestres por apresentar grande produção de raízes tuberosas, com alto teor de amido, hábito anual, fácil propagação por estacas e poucas ramificações (Rogers; Appan 1973; Nassar, Ortiz 2010). Entretanto, as espécies silvestres possuem características adaptativas vantajosas para o cultivo da mandioca e que não estão presentes na espécie cultivada, isto é resistência a seca, a doenças como o vírus do mosaico (CMV) e à bacteriose causada por

Xanthomonas Manihoti (Storey, Nichols; 1938); e conteúdo nutricional mais rico (Nassar, Ortiz 2009; Nassar et al. 2008).

Melhoramento da mandioca

Os programas de melhoramento da cultura têm se concentrado na seleção fenotípica recorrente, isto é seleção entre clones e variedades, assim como em culturas propagadas clonalmente (Jennings, Iglesias 2002; Ceballos et al. 2004; Nassar, Ortiz 2009; Ceballos et al. 2012) em parte isso é devido à dificuldade de replicação por sementes e à baixa eficiência de cruzamentos artificiais (Ceballos et al. 2012). Em geral, este tipo de melhoramento permite encontrar genótipos mais adaptados, apesar de contar com uma base genética restrita e consequente baixa variabilidade, e uma certa melhoria da produtividade em resposta ao cultivo sob condições mais propícias.

Há, no entanto, programas que investem em hibridização com espécies silvestres, as quais se mostraram essenciais para a manutenção da cultura frente às doenças mais agressivas (Thresh, Cooter 2005; Nassar et al. 2008). Entretanto, a hibridização entre espécies é difícil devido a barreiras gaméticas, à associação de características indesejáveis e à necessidade de diversas gerações para superar estas dificuldades (Nassar et al. 1996; Rieseberg, Carney 1998; Ulukan 2009; Nassar, Ortiz 2010).

Outro método comum entre plantas de propagação vegetativa é a duplicação do número cromossômico, ou poliploidia, a partir de tratamentos com anti-mitóticos. A poliploidização permite gerar uma maior variedade de combinações genéticas e consequente variabilidade, mas não representa um aporte muito significativo na produtividade, tendo sido alcançados ganhos de 40% (Jos et al. 1970; Sreekumari et al. 1999). A poliploidização também tem sido utilizada para restauração da fertilidade de híbridos, o que disponibiliza a variabilidade genética alcançada pela hibridização interespecífica (Nassar 2003).

A obtenção de quimeras em mandioca oferece a possibilidade de combinação de características entre espécies de maneira única e terá seu uso viável, uma vez que só se propaga vegetativamente. Além disso, permitirá o uso de espécies não hibridizáveis, devido a esterilidade. As formação de quimeras em *Manihot* permitirá ampliar a variabilidade de características, fato já relatado para outras espécies (Stewart et al. 1972; Zhang et al. 2007). Além disso, a síntese de quimeras oferece a possibilidade de formação de variedades em um tempo relativamente menor que por métodos tradicionais (Burge et al. 2002; Nassar, Bomfim 2013).

Objetivos

No intuito de sintetizar uma quimera em mandioca (*M. esculenta*) que pudesse apresentar características vantajosas da espécie silvestre, induziu-se a formação de brotos quimerais constituídos pela espécie silvestre *M. fortalezensis* e *M. esculenta*, porque estas espécies podem ser enxertadas facilmente (dados não publicados) e possuem número cromossômico diferentes, o que será utilizado como marcadores na identificação da quimera. A afinidade da espécie silvestre à mandioca permitiu a formação de enxertos e brotos quimerais, enquanto a diferença no nível de ploidia permitiu a identificação das espécies constituintes da quimeras. Aliado a estas características, *M. fortalezensis* é uma espécie silvestre e nativa de caatinga, o que a faz ter características adaptativas diferentes das encontradas na mandioca, entre elas relativa tolerância a seca.

Objetivo geral

Combinar características vantajosas das espécies, silvestre, *M. fortalezensis* e cultivada, *M. esculenta* (mandioca).

Objetivos específicos

Sintetizar uma quimera periclinal constituída por uma espécie silvestre *M. fortalezensis* e a cultivada, mandioca.

Identificar a constituição da uma quimera a partir da caracterização morfológica, anatômica e citogenética.

Avaliar o potencial agrônômico deste material baseado em peso de raízes e altura das plantas.

Referências

- Adejumo, A.L., Aderibigbe A. F.; Layokun, S.K., 2011. Cassava Starch: Production, Physicochemical Properties and Hydrolysis- A Review. *Advances in Food and Energy Security Journal Cassava* 1: 8-17.
- Allem, A.C., 1999. The Closest Wild Relatives Of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) *Euphytica* 107: 122-133.
- Allem, A.C., 2002. State Of Conservation And Utilization Of Wild Manihot Genetic Resources And Biodiversity. *PGE Newsletter FAO Biodiversity* 131:16-22
- Burge, G.K., Morgan, E.R.; Seelye, J.F., 2002. Opportunities For Synthetic Plant Chimeral Breeding : Past And Future. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 13–21.
- Carvalho, P.C.L., Carvalho, J.A.B.S.; Allem, A.C., 1995. Conservação De Genótipos Silvestres De Manihot Do Nordeste. In: *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro Conservação*. Ed. Embrapa.
- Ceballos, H., Iglesias, C. A, Pérez, J. C., Dixon, A. G. O., 2004. Cassava Breeding: Opportunities And Challenges. *Plant Molecular Biology* 56: 503–16.
- Ceballos, H., Hershey, C. and Becerra-López-Lavalle, L. A., 2012. New Approaches To Cassava Breeding, in *Plant Breeding Reviews*, Volume 36 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Chacón, J., Madriñán, S., Debouck, D., Rodriguez, F., Tohme, J., 2008. Phylogenetic Patterns In The Genus *Manihot* (*Euphorbiaceae*) Inferred From Analyses Of Nuclear And Chloroplast DNA Regions. *Molecular phylogenetics and evolution* 49: 260–7.
- Chen, L.-P., Ge, Y.-M.; Zhu, X.-Y., 2006. Artificial Synthesis Of Interspecific Chimeras Between Tuber Mustard (*Brassica juncea*) and Cabbage (*Brassica oleracea*) And Cytological Analysis. *Plant Cell Reports* 25: 907–913.
- Evert, R.F., 2006. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development* 3th edn. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- FAO, 2013. *Save and Grow: Cassava - A Guide To Sustainable Production Intensification*. FAO. 140 p.
- Faraldo, M.I., Silva, R. M., Ando, A., Martins, P. S., 2000. Variabilidade Genética De Etnovarietades De Mandioca Em Regiões Geográficas Do Brasil. *Scientia Agricola* 57: 499–505.
- Goffreda, J.C., Szymkowiak, E. J., Sussex, I. M., Mutschler, M. A., 1990. Chimeric Tomato Plants Show That Aphid Resistance And Triacylglycerol Production Are Epidermal Autonomous Characters. *The Plant Cell* 2: 643–649.

Hirata, Y. Motefi, T., Xiao, Q., Noguchi, T., 2000. Artificially-Synthesized Intergeneric Chimera Between *Brassica oleracea* And *Raphanus sativus* By In Vitro Grafting. *Plant Biotechnology*, 17: 195–201.

Hirata, Y. Yagishita, N., Sugimoto, M., Yamamoto, K., 1990. Intervarietal Chimera Formation In Cabbage (*Brassica Oleracea* L). *Japanese Journal of Breeding* 40: 419-425.

IDRC, 2010. Better Cassava Boost Food Security. IDRC Communications - Lasting impacts.

Jennings, D.L.; Iglesias, C., 2002. Breeding For Crop Improvement. In: Cassava: biology, production and utilization. (Eds R. J. Hillocks, J. M. Thresh, A. C. Bellotti). CABI publishing, UK.

Jos, J.S., Magoon, M.L.; Nair, S.G., 1970. A Cytological And Morphological Analysis Of Triploid Cassava. *Genetica Iberica* 22: 27–39.

Kaddoura, R.L.; Mantell, S.H., 1984. Synthesis And Characterization Of *Nicotiana-Solanum* Graft Chimeras. *Annals of Botany* 68 (6), pp.547–556.

Kraus, J.E.; Arduin, M., 1997. Manual Básico De Métodos Em Morfologia Vegetal EDUR, Ed., Seropédica, RJ.

Lindeboom, N., Chang, P.R.; Tyler, R.T., 2004. Analytical, Biochemical And Physicochemical Aspects Of Starch Granule Size, With Emphasis On Small Granule Starches: A Review. *Starch - Stärke*, 56: 89–99.

Liu, Y., 2006. Historical And Modern Genetics Of Plant Graft Hybridization. *Advances in genetics* 56: 101–129.

Lorenzi, J.S., 1978. Variação De Carboidratos E Ácido Cianídrico Em Raízes De Mandioca, Após A Poda Da Parte Aérea. *Bragantia* 16: 139–144.

Marcotrigiano, M.; Gouin, F.R., 1984. Experimentally Synthesized Plant Chimeras 2. A Comparison Of In Vitro And In Vivo Techniques For The Production In Interspecific *Nicotiana* Chimeras. *Annals of Botany* 54: 513–521.

Marcotrigiano, M., 1997. Chimeras And Variegation: Patterns Of Deceit. *HortScience* 32: 773–784.

Marcotrigiano, M., Gradziel, T.M. 1997. Genetic Mosaics And Plant Improvement. In. *Plant Breeding Reviews*. J. Janick, ed. J. Wiley & Sons, Inc., pp. 43–84.

Marcotrigiano, M., 2010. A Role For Leaf Epidermis In The Control Of Leaf Size And The Rate And Extent Of Mesophyll Cell Division. *American Journal of Botany* 97: 224–33.

Mudge, K., Janick, J., Scofield, S. and Goldschmidt, E. E., 2009. A History of Grafting. In *Horticultural Reviews*, Volume 35 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Nassar, N.; Ortiz, R., 2010. Breeding Cassava To Feed The Poor. *Scientific American* 302: 78–82, 84.

Nassar, N.M. A, Hashimoto, D.Y.C.; Fernandes, S.D.C., 2008. Wild *Manihot* Species: Botanical Aspects, Geographic Distribution And Economic Value. *Genetics and molecular research* 7: 16–28.

Nassar, N.M.A., 1978. Conservation of the Genetic Resources of Cassava (*Manihot esculenta*): Determination of Wild Species Localities with Emphasis on Probable Origin. *Economic Botany* 32: 311–320.

Nassar, N.M.A., 1985. *Manihot neusana* Nassar, A New Species Native To Paraná, Brazil. *Canadian Journal of Plant Science* 65: 1097-1100.

Nassar, N.M.A.; Bomfim, N., 2013. Synthesis Of Periclinal Chimera In Cassava. *Genetics And Molecular Research* 12: 610–617.

Nassar, N.M.A., Carvalho, C.G.; Vieira, C., 1996. Overcoming Crossing Barriers Between Cassava, *Manihot esculenta* Crantz And A Wild Relative, *M. pohlii* Warwa. *Brazilian Journal of Genetics* 19: 617–620.

Nassar, N. M. A. and Ortiz, R., 2009. Cassava Genetic Resources: Manipulation For Crop Improvement, In *Plant Breeding Reviews*, Volume 31 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Nassar, N.M.A., Ribeiro, D. G., Bomfim, N. N., Gomes, P. T. C., 2011. *Manihot fortalezensis* Nassar, Ribeiro, Bomfim Et Gomes: A New Species Of *Manihot* From Ceará, Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 831–835.

Pellet, D.; El-Sharkawy, M.A., 1994. Sink-Source Relations In Cassava: Effect Of Reciprocal Grafting In Cassava On Yield And Leaf Photosynthesis. *Experimental agriculture* 30: 359-367.

Pence, V.C.; Engelmann, F., 2011. Collecting In Vitro For Genetic Resources Conservation. In: *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines - 2011 Update*. Crop Genebank knowledge base. Available: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/>.

Pina, A.; Errea, P., 2005. A Review Of New Advances In Mechanism Of Graft Compatibility–Incompatibility. *Scientia Horticulturae* 106: 1–11.

Rieseberg, L.H.; Carney, S., 1998. Plant hybridization. *New Phytologist* 140: 599–524.

Rogers, D.J.; Appan, S.G., 1973. *Manihot* And *Manihotoides* (Euphorbiaceae), *Flora neotropica*, monograph n. 13, 272 p. Haffner, New York, NY.

Satina, S., Blakeslee, A.F.; Avery, A.G., 1940. Demonstration Of The Three Germ Layers In The Shoot Apex Of *Datura* By Means Of Induced Polyploidy In Periclinal Chimeras. *American Journal of Botany*, 27: 895–905.

Sreekumari, M.T., Jos, J.S.; Nair, S.G., 1999. “Sree Harsha”: A Superior Triploid Hybrid In Cassava. *Euphytica* 106: 1–6.

Stegemann, S.; Bock, R., 2009. Exchange Of Genetic Material Between Cells In Plant Tissue Grafts. *Science* 324: 649–51.

Stewart, A.R.N., Burk, L. G., Burk, G., Carolina, N., 1970. Independence Of Tissues Derived From Apical Layers In Ontogeny Of Tobacco Leaf And Ovary 57: 1010–1016.

Stewart, R.N., Meyer, F.G.; Dermen, H., 1972. *Camellia* Onto Daisy A Graft Chimera Of *Camellia sasanqua* And *C. japonica*. American Journal of Botany 59: 515–524.

Szymkowiak, E.J.; Sussex, I.M., 1996. What Chimeras Can Tell Us About Plant Development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47: 351–376.

Thresh, J.M.; Cooter, R.J., 2005. Strategies For Controlling Cassava Mosaic Virus Disease In Africa. Plant Pathology 54: 587–614.

Ulukan, H., 2009. The Evolution Of Cultivated Plant Species: Classical Plant Breeding Versus Genetic Engineering. Plant Systematics and Evolution 280: 133–142.

Wang, Y. Cheng, Q., Zhu, X.-Y., Chen, L.-P., 2010. Studies On Reproductive Characteristics Of An Interspecific Chimera Between *Brassica juncea* And *Brassica oleracea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 209–215.

Zhang, M. Deng, X., Qin, C., Chen, C., Zhang, H., Liu, Q., 2007. Characterization of a New Natural Periclinal Navel – Satsuma Chimera of *Citrus*: “ Zaohong ” Navel Orange. Journal of American Society of Horticultural Science 132: 374–380.

Zhou, J. Hirata, Y., Nou, I., Shiotani, H., Ito, T., 2002. Interactions Between Different Genotypic Tissues In *Citrus* Graft Chimeras. Euphytica 126: 355–364.

Zhu, X.-Y. , Chai, S.-J., Chen, L.-P., Zhang, M.-F., Yu, J.-Q., 2007. Induction And Origin Of Adventitious Shoots From Chimeras Of *Brassica juncea* And *Brassica oleracea*. Plant cell reports 26:1727–1732.

Capítulo 2: Primeiro artigo

Este capítulo apresenta o primeiro artigo publicado, referente a síntese da primeira quimera. Este artigo foi publicado na revista *Genetics and Molecular Research* 12 (1): 610-617 publicada em 2013. Uma descrição morfológica detalhada desta quimera pode ser encontrada na revista *Geneconserve* 12 (48):15-17 publicada em 2013. Neste capítulo alguns acréscimos e alterações foram feitas quando comparados ao artigo original.

Síntese de quimera periclinal em mandioca

N.M.A. Nassar e N. Bomfim

*Departamento de Genética e Morfologia, Universidade de Brasília,
Brasília, DF, Brasil*

Autor para correspondência: N.M.A. Nassar

E-mail: nagnassa@rudah.com.br

Genetics and Molecular Research 12 (1): 610-617 (2013).

Resumo

Nós fornecemos o primeiro relato sobre a síntese de uma quimera periclinal interespecífica muito produtiva, com raízes grandes e comestíveis. O tecido da epiderme da quimera foi formado pela espécie cultivada *M. esculenta* (E), e os tecidos da subepiderme e interno foram formados pela espécie silvestre, *Manihot fortalezensis* (F). Nós utilizamos análises citogenéticas e morfológicas para determinar a origem de todos os tecidos. Estes resultados podem oferecer potencial para o desenvolvimento de novas linhagens para o melhoramento de plantas baseada no uso de quimeras compostas por diferentes combinações de espécies silvestres e cultivares.

Palavras-chave: *Manihot*. Enxertia, Raízes comestíveis.

Introdução

A mandioca é a principal fonte de alimento para mais de 800 milhões de pessoas nos trópicos e subtropicais (FAO, 2009). Nos últimos 50 anos, os programas de melhoramento de culturas têm se concentrado na seleção clonal e na hibridização intervarietal (Nassar e Ortiz, 2009). Os estudos de hibridização interespecífica objetivando incorporar características desejáveis de espécies silvestres às cultivares podem ser particularmente difíceis devido a forte barreira interespecífica e a

necessidade de conduzir diversos retro cruzamentos, os quais podem levar diversas décadas ou mais (Nassar e Ortiz, 2010). Alguns autores têm se referido à importância de quimeras (Burge et al., 2002; Nassar, 2003, 2004), outros propuseram a utilização de quimeras para combinar características potencialmente úteis de populações silvestres e cultivares (Goffeda et al., 1990; Burge et al., 2002). Entretanto, nenhuma tentativa experimental foi direcionada para melhorar as características econômicas usando esta técnica. Nós aqui apresentamos resultados da síntese de uma quimera periclinal das espécies silvestres de *Manihot*, *M. fortalezensis*, e a espécie cultivada, mandioca, *M. esculenta*.

Quimeras vegetais ocorreram raramente na natureza, enquanto outras foram sintetizadas artificialmente entre diferentes espécies (Marcotrigiano e Gouin, 1984; Kaddoura e Mantell, 1991; Chen et al, 2006; Wang et al., 2011), mas nenhuma resultou ainda em caracteres econômicos melhorados. Em vez disso os estudos anteriores em quimeras vegetais visaram examinar ontogenia e aspectos botânicos puros.

Outras tentativas de produzir quimeras foram anteriormente realizadas por cultura de tecidos; entretanto muito poucas sobreviveram para produzir plantas maduras ou foram capazes de estabelecer uma nova linhagem quimeral (Kaddoura e Mantel, 1991; Chen et al., 2006).

Poucas quimeras interespecíficas se originaram de brotos que surgiram da união entre enxerto e porta enxerto (E.g., Stewart et al., 1972; Burge et al., 2002; Zhou et al., 2002; Chen et al., 2006; Zhang et al., 2007). Embora nenhum valor econômico direto dessas quimeras tenha sido determinado nesses estudos anteriores, estes pesquisadores previram um futuro potencial de sintetizar quimeras para este propósito.

No presente estudo nós sintetizamos, pela primeira vez, uma quimera interespecífica periclinal de duas espécies de *Manihot* que diferem em número cromossômico e nível de ploidia. Uma dessas, UnB 201, é um cultivar conhecido pela sua boa qualidade nutricional e sabor, mas tem baixa produtividade (Nassar et al., 2011a). Ela é, particularmente suscetível à infestação por brocas e é altamente vulnerável à seca. A segunda espécie *M. fortalezensis*, é bem adaptada à seca, tolerante a brocas e é conhecida por suas raízes que podem capturar água de partes profundas do solo (Nassar et al., 2011b).

Material e Métodos

Material Vegetal

Duas espécies de *Manihot* foram utilizadas no estudo: *M. fortalezensis* (F), e a variedade UnB 201 da espécie cultivada *M. esculenta* (Mandioca) (E). Ambas as espécies foram mantidas na coleção viva da Universidade de Brasília (UnB).

M. fortalezensis é um arbusto ereto ca. 4m, lenhoso e com raízes fibrosas profundas e nativo da caatinga, Ceará, Brasil onde a seca é predominante (Nassar et al., 2011b). A variedade de mandioca UnB 201 é um arbusto baixo com 1–1.50 m de altura. Ele foi selecionado a partir de uma

variedade de mandioca indígena com alto teor de proteína e caroteno, com excelente palatabilidade e produzindo raízes comestíveis de 2 a 3 quilos por planta aos 12 meses (Nassar et al., 2007, 2011a).

Síntese de Quimera

Estacas de *M. fortalezensis* foram enxertadas sobre 40 portas enxertos da variedade UnB 201. Após um ano, os enxertos já crescidos foram removidos com um corte paralelo à união entre enxerto e porta enxerto deixando somente 5 cm do tecido dos enxertos. Essa união e os tecidos remanescente foram cobertos por algodão ao qual foi adicionado 4 gotas da solução de ácido naftalenoacético 10 mg/l dissolvido em água destilada. Os brotos formados nas laterais do caule dos enxertos foram removidos.

Ao fim da estação de crescimento os brotos morfologicamente distintos dos pais foram propagados vegetativamente. Apenas dois brotos surgiram dentre os 40 tratamentos. E apenas um deles foi utilizado para este estudo. A planta madura que se originou deste broto foi cortada em 18 estacas propagáveis, as quais foram plantadas sob as mesmas condições que estacas das espécies parentais. Após o crescimento destas plantas, frutos, folhas e raízes foram examinados morfologicamente botões florais e pontas de raízes adventícias foram coletados e examinados citogeneticamente para avaliação do número cromossômico. Além disso, o peso das raízes da quimera foi comparada à dos parentais.

Análise Citogenética

Botões masculinos foram coletados, fixados em solução de carnoy, preservado em etanol 70% e esmagados com uma gota de solução de acetocarmina a 1%.

Pontas de raízes foram coletadas de estacas da quimera, pré-tratadas com solução de colchicina a 0,25% em água destilada por 1 hora, fixada em solução de carnoy preservada em etanol 70%, hidrolisada em HCL 1N por 10 minutos e esmagadas e coradas com solução de acetocarmina a 1%.

Exame Morfológico

Caracteres morfológicos como o formato da folha, características da raiz e fruto das 18 plantas clones foram comparadas aos parentais *M. fortalezensis* e *M. esculenta*.

Resultados

Duas quimeras fenotipicamente similares foram obtidas a partir de estacas enxertadas, o que representa a frequência de 5% de indução quimeral (2/40). Essas plantas foram propagadas por estacas e um total de 18 plantas cresceram por um ano.

A identificação de quimeras foi possível baseada na morfologia foliar e no formato dos frutos. As folhas da quimera eram notavelmente diferentes em tamanho e forma em relação às duas espécies parentais (Figura 4A e B). O fruto da quimera era alado apesar de ser produzido na estaca de *M. fortalezensis*, a qual produz frutos normalmente esféricos (Figura 4B). Considerando que a

camada externa do fruto normalmente se deriva da camada meristemática mais externa do ápice caulinar (L1) (Goffreda et al., 1990; Zhou et al., 2002), foi concluído que a quimera foi formada pela epiderme da mandioca, *M. esculenta* (E).



Figura 4 Características morfológicas da Quimera (EFF) comparada aos parentais. A: Folhas: *M. fortalezensis* (esquerda), Quimera (centro), variedade de mandioca (direita). B.: Frutos: *M. fortalezensis* (esquerda), quimera (centro), variedade de mandioca UnB 201 (direita). Barra= 10 cm.

Tabela 1 Características morfológicas das plantas quimerais (EFF) e seus parentais, *Manihot fortalezensis* e a variedade de mandioca UnB 201.

Característica	<i>M. fortalezensis</i> (FFF)	Quimera (EFF)	Mandioca variedade UnB 201 (EEE)
Crescimento e caule	Arbusto ereto normalmente solitário, ca. 8m, 7-10cm de diâmetro, 4-5m de altura com 1 ano. Ramificações eretas. Padrão de ramificação dicótomo apenas na parte apical. Caules jovens vermelhos. Nós do caule levemente proeminentes, e cicatrizes das estípulas não proeminentes	Arbusto semiereto ca. 5m, 1-2 caules centrais saindo da mesma base, 5-10 cm em diâmetro, 5-6 m de altura com 1 ano. Ramificação decumbente. Padrão de ramificação dicótomo e tricótomo. Caules jovens roxos. Nós e cicatrizes das estípulas levemente proeminentes.	Arbusto ereto ca. 2m, 2-3 caules saindo da mesma base, 2-5 cm de diâmetro, 1-2 m de altura com 1 ano. Ramificação semi-decumbente, com padrão dicótomo ou tricótomos. Caules jovens vermelhos esverdeados. Nós e cicatrizes das estípulas proeminentes.
Folhas	Folhas com 3, 5, 7 lobos, normalmente peltado, face adaxial verde clara, e face abaxial verde glauca. Lobos centrais muito obovados com ápice apiculado. Comprimento dos pecíolos 10-25 cm.	Folhas palmadas com 2 a 5 lobos, semi-peltadas à emarginadas, face adaxial verde escura e face abaxial verde esbranquiçado. Lobos centrais obovados com ápice subapiculado. Comprimento dos pecíolos 8-15 cm.	Folhas 3-5 lobos, emarginados, face abaxial verde escura e face abaxial verde glauca. Lobos centrais oblongos -lanceolados com ápice agudo acuminado. Comprimento dos pecíolos de 5-13 cm.
Inflorescência	Inflorescência em panícula com 2 ramos laterais saindo da mesma base, com flores pistiladas na panícula central. Ovários não alados.	Inflorescência em panícula com 2-3 ramos laterais saindo da mesma base. Ovários não alados.	Inflorescência em panícula com 2-4 ramos laterais saindo da mesma base. Ovários com asas onduladas.
Frutos	Frutos esféricos levemente alados na base e ausentes no ápice do fruto e com pedúnculo formando um pequeno globo próximo ao fruto.	Frutos esféricos, com asas proeminentes com pedúnculo formando um globo perto do fruto.	Frutos semiesféricos com asas proeminentes levemente onduladas, com pedúnculo engrossado.
Raiz	6-7 raízes fibrosas profundas; 100-120 cm de comprimento.	7-8 raízes comestíveis e 3-4 raízes fibrosas. Raízes comestíveis com 60-70 cm cada, cilíndricas, 10 cm de diâmetro, peso 10-12 Kg, polpa macia e com cheiro de Ácido Cianídrico.	4-5 raízes comestíveis, cônicas, 30 cm de comprimento, pele escura, pesando 2-3 Kg, excelente palatabilidade da polpa macia, baixo teor de ácido cianídrico, sem raízes fibrosas.

A investigação meiótica dos botões florais da quimera revelaram um número cromossômico $2n=54$, o qual é o mesmo de *M. fortalezensis* (Figure 5A), indicando que a constituição da camada L2 é de *M. fortalezensis*. A investigação das pontas de raízes das duas quimeras também revelaram um número cromossômico $2n=54$. Uma vez que raízes normalmente se originam do tecido interno periciclo isso demonstra que a camada L3 era composta por *M. fortalezensis*. E desta forma conclui-se que a constituição final da quimera é EFF.

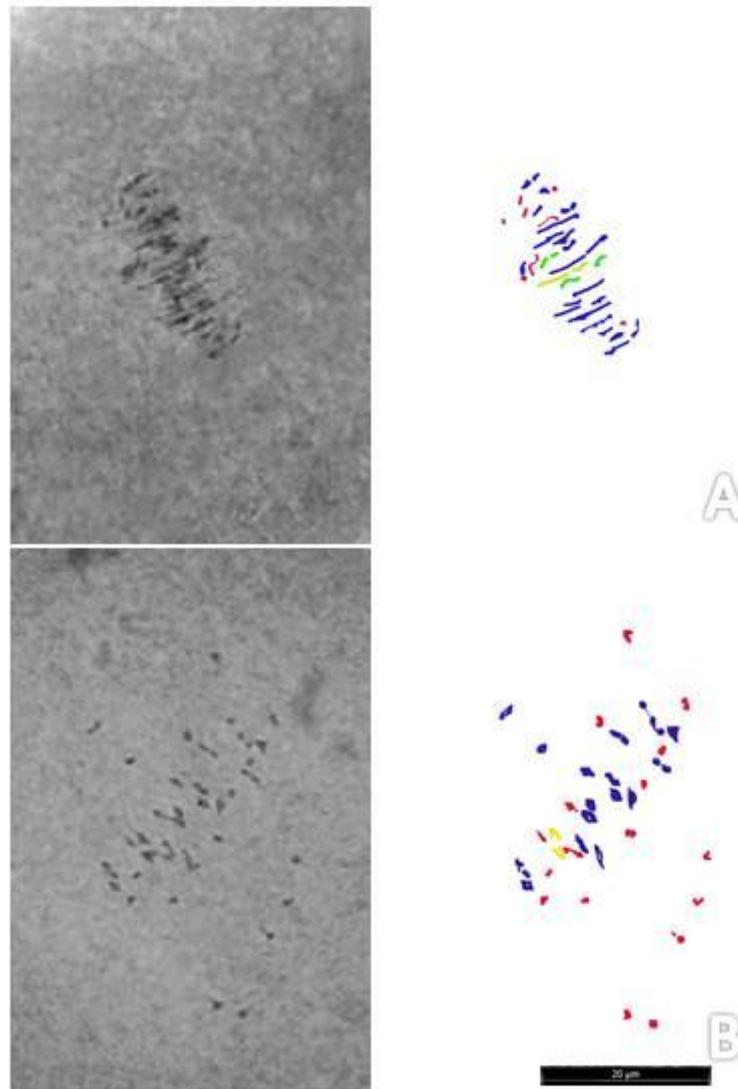


Figura 5 Metáfase meiótica I mostrando número cromossômico. A. *Manihot fortalezensis* (FFF), $2n=54$, 23 bivalentes (20 em azul e 3 pares recentemente separados: 2 em verde e 1 em amarelo). B.: Quimera de mandioca (EFF), $2n=54$, 17 bivalentes (16 em azul e 1 recentemente separado em amarelo), 17 univalentes (vermelho), 1 trivalente (azul).

Após um ano as quimeras propagadas mostraram um crescimento extremamente vigoroso (quase três vezes maior) comparado ao crescimento das parentais (Figura 6), e diâmetros de caule maiores que a espécie parental mandioca.



Figura 6 Crescimento vigoroso da Quimera (EFF) comparado ao do parental *M. esculenta* Variedade UnB 201. A. Quimera.; B. Mandioca variedade UnB 201.

Discussão

A observação mais interessante na formação da quimera foi o desenvolvimento de raízes comestíveis extremamente grandes se comparadas às de mandioca. O peso da raiz alcançou 10-12 kg em todas as plantas com um ano de idade, enquanto plantas de mandioca, UnB 201, com essa mesma idade atingiram 2-3 kg. A quimera, portanto, teve um aumento de cinco vezes em sua produtividade. Em contrapartida, a espécie *M. fortalezensis* não forma raízes comestíveis, mas forma raízes fibrosas. Além da formação de grandes raízes comestíveis, as quimeras também adquiriram raízes fibrosas profundas; uma indicação de boa tolerância à seca, já que essas raízes possibilitam à absorção mais eficiente de água subterrânea. Visto que quimeras são um mosaico de células geneticamente diferentes no meristema apical caulinar, interações entre elas em um mesmo tecido podem resultar na modificação de caracteres. Estudos recentes sugerem que a transferência de RNA, ou mesmo DNA, para células adjacentes em enxertos induzem efeitos epigenéticos (Stegemann e Bock, 2009).

A diferença em número cromossômico observada durante meiose e mitose foi usada para detectar a constituição quimeral, e revelou o aspecto mais interessante dessa quimera, produzidas a partir de enxertia; a coexistência harmônica de tecidos geneticamente e cromossomicamente

diferentes. Em particular, essa combinação resultou na produção de uma planta caracterizada por um crescimento vigoroso e enormes raízes comestíveis. Essas características com certeza favorecem o uso dessa quimera para o melhoramento no futuro. Além disso, pelo fato de raízes comestíveis de mandioca serem a principal fonte de alimento para populações mais pobres nos trópicos, a síntese dessa quimera altamente produtiva pode levar a uma nova linha de pesquisa que adote a técnica de produção de quimeras para o melhoramento dessa cultura. Variando a combinação de espécies silvestres e de mandioca, uma grande diversidade de quimeras pode ser gerada para diferentes propósitos.

A síntese de quimeras oferece vantagens práticas para a produção de plantas resistentes a doenças e insetos por causa da camada mais externa de uma espécie resistente pode ser expressada em uma camada, mais interna, de mandioca. Em conjunto, essa técnica pode resultar no desenvolvimento de um nova variedade resistente, tolerante a seca e produtivo em um curto período de tempo de apenas 1 ou 2 anos.

Agradecimentos

A pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ao N.M.A Nassar, e bolsa de estudos de N. Bomfim pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A coleção viva de espécies silvestres de *Manihot* foi estabelecida na UNB com o suporte do International Development Research Centre (IDRC).

Referências

Burge, G. K.; Morgan, E. R. and Seelye; J. F.,2002. Opportunities For Synthetic Plant Chimeral Breeding: Past And Future. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 70: 13-21, 2002.

Chen, LP. Ge YM and Zhu XY.,2006. Artificial Synthesis Of Interspecific Chimeras Between Tuber Mustard (*Brassica juncea*) And Cabbage (*Brassica oleracea*) And Cytological Analysis. *Plant Cell Report*. 25: 907-913.

Zhang, M. Deng, X., Qin, C., Chen, C., Zhang, H., Liu, Q., 2007. Characterization of a New Natural Periclinal Navel – Satsuma Chimera of Citrus: “ Zaohong ” Navel Orange. *Journal of American Society of Horticultural Science* 132: 374–380.

FAO (2009). *Production Yearbook*. Food and Agriculture Organization, Rome.

Goffreda J. C. , Szymkowiak, E. J. , Sussex B. I. M. and Mutschler M. A.,1990). Chimeric Tomato Plants Show That Aphid Resistance And Triacylglycerol Production Are Epidermal Autonomous Characters. *Plant Cell* 2: 643-649.

Kaddoura R. L. and Mantell, S. H., 1991. Synthesis And Characterization Of *Nicotiana-Solanum* Graft Chimeras. *Annals of Botany* 68: 547-556.

Marcotrigiano M. and Gouin, F. R., 1984. Experimentally Synthesized Plant Chimeras. 2. A Comparison Of In Vitro And In Vivo Techniques For The Production Of Interspecific *Nicotiana* Chimeras. *Annals of Botany* 54: 513-521.

Nassar N. M. A. 2003. Fertility And Chimera Induction In Cassava Interspecific Hybrids. *Gene Conserve* 2: 117-123.

Nassar, N. M. A. 2004. Polyploidy, Chimera And Fertility Of Interspecific Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Hybrids. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 64: 132-133.

Nassar, N. M. A. and Ortiz, R., 2009. Cassava Genetic Resources: Manipulation for Crop Improvement. In: *Plant Breeding Reviews*, Volume 31 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Nassar, N. and Ortiz, R., 2010. Breeding cassava to feed the poor. *Scientific American*. 302: 78-82, 84.

Nassar, N. M. A., Vizzotto, C. S., Schwartz, C. A. and Pires Jr, O. R., 2007. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. *Genetics and Molecular Research*. 6: 116-121.

Nassar, N. M. A Bomfim N. N., Elsayed A. Y. and Freitas C. S., 2011a. Interesting Cassava Cultivars 1. *Unb* 201. *Gene Conserve* 10: 183-185.

Nassar, Ribeiro, D. G., Bomfim, N. N. and Gomes, P. T. C., 2011b. *Manihot Fortalezensis* Nassar, Ribeiro, Bomfim Et Gomes A New Species Of *Manihot* From Ceará, Brasil. *Genetic Resource and Crop Evolution*. 58: 831-835.

Stegemann, S and Bock, R, 2009. Exchange Of Genetic Material Between Cells In Plant Tissue Grafts. *Science* 324: 649-651.

Stewart, R. N. , Meyer, F. G. and Dermen, H., 1972. *Camellia* + 'Daisy Eagleson', A Graft Chimera Of *Camellia sasanqua* And *C. japonica*. *American Journal of Botany* 59: 515-524.

Wang Y., Cheng Q., Zhu X. Y. and Chen L. P., 2011. Studies On Reproductive Characteristics Of An Interspecific Chimera Between *Brassica juncea* And *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 209-215.

Zhou J, Hirata Y, Nou IS, Shiotani H, et al., 2002. Interactions Between Different Genotypic Tissues In *Citrus* Graft Chimeras. *Euphytica* 126: 355-364.

Capítulo 3: Segundo artigo

Neste capítulo consta o artigo referente à síntese da segunda quimera. Este artigo está disponível na Revista Genetics and Molecular Research 13 (1): 819-830 publicado em 2014. Nele além dos marcadores morfológicos utilizados, para identificação da quimera descrita anteriormente, no capítulo 2 (UnB 701), também foram utilizados alguns marcadores anatômicos para esclarecer a constituição da camada L1. Adicionalmente as raízes tuberosas também foram avaliadas anatomicamente para comprovar a constituição tuberosa das raízes.

A utilização de quimeras periclinais como método de melhoramento pode impulsionar a produção de raízes tuberosas em mandioca

Nayra N. Bomfim¹ e Nagib M. A. Nassar²

¹Programa de Pós-Graduação em Botânica e ²Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

Autor para correspondência: nagibnassar@geneconserve.pro.br

Genetics and Molecular Research 13 (1): 819-830 (2014)

Resumo

Quimeras vegetais periclinais são mosaicos genotípicos organizados concentricamente. Tentativas de produzi-las para combinar características de diferentes espécies tem sido feitas, mas resultados viáveis, ainda não foram alcançados. A mandioca, uma das principais culturas alimentícias do mundo, pode ter suas características melhoradas com espécies silvestres. Este artigo relata uma quimera periclinal altamente produtiva derivada de mandioca, constituída pela epiderme da mandioca e tecidos internos da espécie silvestre. Ela produziu grandes raízes tuberosas com 14 Kg por planta aos 12 meses de plantada, comparada a 2-3 Kg produzido por variedades comuns. Estes resultados fornecem uma nova abordagem para o melhoramento da mandioca baseado na síntese de quimeras interespecíficas.

Palavras-chave: Meristema apical caulinar. Tamanho da raiz. Interação epigenética entre espécies. *M. fortalezensis*. Qualidade do amido. *Manihot* silvestre.

Introdução

A mandioca é base alimentar para pelo menos 800 milhões de pessoas nos trópicos e subtropicais (FAO 2013). Os programas de melhoramento têm se concentrado na simples seleção clonal e na hibridização entre cultivares (Ceballos et al. 2004; Nassar; Ortiz 2009). A hibridização

interespecífica para transferir caracteres é difícil devido a barreiras entre as espécies e à necessidade de quebrá-las (Nassar et al. 1996; Rieseberg; Carney 1998). Além disso, a associação de caracteres indesejáveis que vem da espécie silvestre é outra desvantagem, que requer tempo através de várias gerações para superar esta indesejável barreira (Rieseberg; Carney 1998; Ulukan 2009). Já a poliploidia tem pouco para oferecer ao melhoramento genético porque novas características não são formadas por essa técnica (Sreekumari et al. 1999; Aversano et al. 2013). Houve sugestões de produzir quimeras para combinar caracteres úteis das formas silvestres e cultivadas (e.g. resistência da planta hospedeira à insetos encontrados no tecido epidermal), mas resultados práticos, isto é que pudessem ser cultivados amplamente, ainda não foram alcançados (Goffreda et al. 1990; Marcotrigiano, Gradziel 1997; Burge et al. 2002; Nassar; Ortiz 2010).

Quimeras interespecíficas foram documentadas por alguns autores (Stewart et al. 1972; Kaddoura Mantell 1984; Zhou et al. 2002; Chen et al. 2006; Zhang et al. 2007). Elas surgiram de brotos adventícios formados na união entre o enxerto e o porta-enxerto, em condições de campo ou por cultura de tecidos para diferentes propósitos, mas não para formação de variedades vantajosas, e por isso também sem valor econômico significativo (Goffreda et al. 1990; Marcotrigiano, Gradziel 1997; Burge et al. 2002; Chen et al. 2006).

Em artigo anterior relatou-se uma quimera periclinal altamente produtiva formada pela variedade de mandioca UnB 201 e *M. fortalezensis* (Nassar; Bomfim 2013). No presente artigo, nós relatamos a síntese de uma quimera periclinal envolvendo outra variedade de mandioca, a UnB 032, com a espécie silvestre *M. fortalezensis*, as quais também diferem em nível de ploidia. Nós usamos a variedade UnB 032, por ser conhecida por sua qualidade de consumo e moderada produtividade, mas que é susceptível à brocas e vulnerável à seca; e a espécie silvestre *Manihot fortalezensis* que mostra alguma resistência à broca e se adapta bem à seca por causa de suas raízes profundas (Nassar et al. 2010).

Material e métodos

Material vegetal

A variedade de mandioca UnB 032 e a espécie silvestre *M. fortalezensis* foram utilizadas para induzir quimeras interespecíficas. UnB 032 é diploide ($2n=36$), arbusto baixo com 2m de altura, e produção de 2 a 3 Kg ano⁻¹, enquanto *M. fortalezensis* é uma espécie triploide ($2n=54$) nativa da Caatinga, onde seca ocorre frequentemente. Essa espécie apresenta hábito arbustivo ereto, ca. 4m com raízes fibrosas profundas. Ambas são mantidas na Coleção da Universidade de Brasília (UnB).

Amostras para determinar o genótipo de cada camada foram coletadas de 9 plantas clones. Elas foram replicadas por estacas advindas da planta quimera (surgida da região de fusão entre enxertos da UnB 032 e *M. fortalezensis*) e das espécies parentais (UnB 032 e *M. fortalezensis*). Todos as plantas clones foram plantadas na mesma semana, e cultivadas sob sol.

Síntese da Quimera (Fig.7)

Caules de *M. fortalezensis* foram enxertados sobre 40 porta-enxertos da UnB 032. Foram feitos enxertos do tipo garfagem em bisel. Dois meses depois, um corte paralelo à união dos enxertos foi feito deixando 5 mm da parte superior do enxerto. A união foi coberta com algodão umedecidos com 4 gotas de 10mg/L de ácido naftaleno acético por 7 dias (adaptado de Kaddoura; Mantell, 1991). No fim da estação de crescimento, os brotos que exibiam caracteres morfológicos distintos foram vegetativamente propagados para reconhecimento dos tecidos constitutivos. A morfologia dos frutos, folha e raiz; meiose nos botões florais e mitose nas pontas de raízes, as secções transversais do pecíolo e secções longitudinais dos ápices caulinares foram analisadas para determinar a constituição de cada camada. As raízes derivadas de quimeras foram comparadas às dos pais.

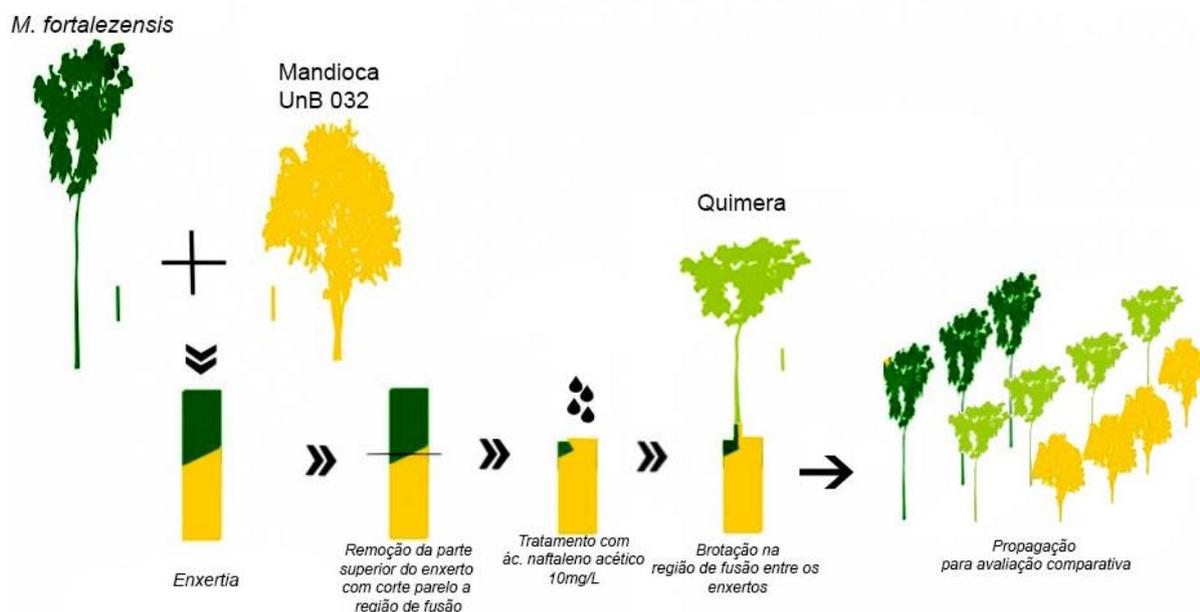


Figura 7 Formação da quimera a partir da enxertia. Esquema representando os passos para formação e estabelecimento do experimento

Caracterização morfológica

Nove plantas com 12 meses de idade foram caracterizadas usando descritores distintivos como hábito de crescimento, características foliares, da inflorescência, frutos e raízes, as quais são utilizadas para distinguir mandioca (*M. esculenta*) das espécies silvestres de *Manihot* (Nassar et al. 1996; Rogers; Appan 1973).

Análise citogenética

Botões e flores pré-antese masculinas de ambos os parentais e suas quimeras derivadas foram coletados às 8 h a.m. (Horário de verão brasileiro), fixadas em solução de carnoy, preservadas em etanol 70%, esmagadas e corados em solução de carmina em ácido acético à 1 %. Pontas de raízes foram coletadas de raízes adventícias (germinadas de estacas), pré-tratadas com 0,25% de

colchicina em água destilada por 2h, fixadas em solução de carnoy, hidrolisadas em HCl 5N por 10 min, esmagadas e secas antes de serem coradas com 5% Giemsa (adaptado de Carvalho; Guerra, 2002).

Avaliação anatômica

Meristemas apicais caulinares (MAC), pecíolos e lâminas foliares foram analisadas para deduzir a constituição das camadas meristemáticas da quimera. Os ápices meristemáticos apresentam uma organização em três camadas, denominadas L1 (a mais externa), L2 (a camada subsequente) e L3 (a mais interna) (Marcotrigiano 1997). Secções longitudinais de MAC, transversais de pecíolos e raízes; e paradérmicos de folhas do 6º nó foram avaliados. Todas as amostras foram fixadas em solução de FAA 70 (Formaldeído, Ácido acético e etanol 70% , 1:1:18, v/v) (Johansen 1940) e montadas em resina sintética após coloração e seccionamento (Paiva et al. 2006). MAC foi infiltrado por parafina, seccionado em 8 µm em micrótomo rotativo RM2145 (Leica, Germany) e corado com safranina e *fast-green* (Kraus; Arduin 1997). A superfície da lâmina foliar foi liberada em solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético (1:1, v/v) e corados com safranina à 1%. As raízes foram seccionadas a mão livre e tratadas com solução iodada lugol (Johansen 1940). As imagens dos tricomas foram feitas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 700 1-F, após cobertura com ouro no metalizador Leica EM SCD.

Os atributos epidérmicos, formato de células epidérmicas comuns, tricomas, comprimento dos estômatos e largura das células epidérmicas comuns foram utilizadas para deduzir a origem de L1, uma vez que são derivados dela (Goffreda et al. 1990; Burge et al. 2002). Pelo menos 4 plantas clones foram amostradas para avaliação destes atributos, sendo 5 plantas para avaliação do comprimento dos estômatos . Comprimento estomático e frequência de tricomas foram determinadas em folhas frescas do 4ª e 6ª nó, com base nas impressões das faces abaxiais em esmalte; enquanto a largura das células do pecíolo foram medidas em folhas frescas do 6º nó. O tamanho e distribuição dos grãos de amido foram avaliados em raízes com 3 cm de diâmetro de duas plantas com 12 meses de plantadas para avaliação do potencial alimentício.

As fotos foram tiradas sob microscópio ótico (Leica DM2500, Germany). Ápices caulinares foram fotografados usando contraste interferencial de fase.

Produção de raízes

O peso das raízes foi medido para estimar o potencial de produção da Quimera 3. Foram pesadas todas as raízes de duas plantas clones com 12 meses.

Análise estatística

As medidas foram tiradas usando-se Image-Pro Plus version 4.5.29 e as análises estatísticas foram feitas com o software Assisat 7.6 beta. A variação de comprimento estomático, largura das

células epidérmicas e corticais do pecíolo foram analisadas usando a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (P=0,05) para comparar as médias.

Resultados e Discussão

Potencial de produção da Quimera

A quimera mostrou um fenótipo distinto dos pais, e foi classificada como periclinal por apresentar características uniformes em toda a planta. Alguns caracteres eram distintos das espécies parentais, *M. fortalezensis* e *M. esculenta* UnB 032, tais como altura, ramificação, formato das folhas, das asas dos frutos e das raízes (Tab. 1), o que sugerimos ser um resultado da combinação entre as duas espécies.

Tabela 2 Caracterização morfológica da Quimera 3 comparada às espécies parentais *Manihot fortalezensis* e *M. esculenta* da variedade UnB 032.

	<i>M. fortalezensis</i> (FFF)	Quimera 3 (EFF)	Mandioca Variedade UnB 032 (EEE)
Hábito, Caules	Arbusto ereto normalmente solitário, ca. 8m, 7-10cm diâmetro, ramificações eretas e dicótoma apenas na parte apical. Caules jovens vermelhos. Nós levemente proeminentes, e cicatrizes da estípula não proeminentes.	Arbusto semiereto ca. 4m, 1-2 caules centrais saindo da mesma base, 2-5cm diâmetro, ramificações semieretas, dicótoma e tricótoma. Caules jovens roxos. Parte superior dos caules jovens tetragonal. Nós e cicatrizes das estípulas proeminentes.	Arbusto ereto ca. 2m, 2-3 caules centrais saindo da mesma base, 1 -5 cm diâmetro, caule ereto, ramificação dicótoma e tricótoma. Caules jovens vermelho esverdeado. Nós e cicatrizes das estípulas pequenos e proeminentes.
Folhas	Folhas 3,5 ou 7 lobos, normalmente peltadas, face adaxial verde clara e face abaxial verde glauca. Lobos centrais muito obovados com ápice apiculado. Comprimento do pecíolo 10-25 cm.	Folhas palmadas com 1-7 lobos, normalmente com 5 lobos, brevi-peltados, faces abaxiais e adaxiais verde escura. Lobos centrais obovados com ápice apiculado. Comprimento do pecíolo 10-40 cm.	Folhas palmadas com 1-5 lobos, emarginadas, Faces abaxiais e adaxiais verde escuras. Lobos centrais oblongos-lanceolados com ápice acuminado. Comprimento do pecíolo 7-30 cm.
Inflorescência	Inflorescência em panícula com 2 ramos laterais saindo da mesma base, com flores pistiladas na panícula central. Comprimento das flores 15 mm. Ovários não alados.	Inflorescência em panícula com 2-3 ramos laterais saindo da mesma base. Comprimento das flores 14 mm. Ovários alados.	Inflorescência em panícula com 2-3 ramos laterais saindo da mesma base. Comprimento das flores 9mm. Ovários alados com asas vermelhas.
Frutos	Frutos globosos não alados, exceto na base, onde são discretas e lisas, com pedúnculo formando um globo próximo ao fruto.	Frutos globosos com asas discretas e lisas em todos o fruto, com pedúnculo formando um globo próximo ao fruto.	Frutos semiesférico com asas onduladas em todo o fruto, e pedúnculo engrossado.
Raízes¹	Raízes alcançando 1,5 m. Predominantemente estreiras e fibrosas, com no máximo 2,5 cm de diâmetro.	Raízes tuberosas cilíndricas com até 90 cm de comprimento. Predominantemente tuberosas com 5 cm diâmetro e periderme creme.	Raízes tuberosas cônicas com 30 cm de comprimento. Predominantemente tuberosas com 7 cm de diâmetro (na base). Periderme creme clara.

¹Plantas com 12 meses de plantadas.

A Quimera 3 mostrou ser mais vigorosa que ambas espécies parentais, pois produziu raízes 7 vezes maiores que as da mandioca (UnB 032), enquanto a espécie silvestre *M. fortalezensis* não produziu raízes tuberosas. As raízes da quimera aos 12 meses são longas, tuberosas e pesam 14 Kg por planta, enquanto as raízes da variedade de mandioca UnB 032 apesar de tuberosas, são curtas e pesam apenas 2.1Kg por planta com a mesma idade. Este fenótipo demonstra ser uma combinação entre as duas espécies parentais, uma vez que combina as raízes longas de *M. fortalezensis* e tuberosas da variedade UnB 032 (Figura 8), sendo que a espécie silvestre produz raízes fibrosas, i.e. não tuberosas, e a mandioca (UnB 032) não produz raízes longas. Este novo fenótipo pode ser atribuído à interação epigenética entre as espécies, isto é dos tecidos internos triploides de *M. fortalezensis* e com os tecidos epidermais diploides da mandioca, UnB 032, que coexistem na quimera. Recentemente, foram relatadas alterações epigenéticas causando mudanças fenotípicas como a altura das plantas (Johannes et al. 2009). Estas alterações epigenéticas se mostraram estáveis e herdáveis. Alterações epigenéticas semelhantes foram observadas em plantas onde duas espécies coexistiam no mesmo indivíduo. Estas alterações ocorreram na metilação de DNA em locus específicos e foram atribuídas à interação entre espécies (Wu et al. 2013). Mudanças fenotípicas, como a heterose comum em híbridos, e as notadas em enxertos, conhecidas por "*graft hybridization*", foram relacionadas à alterações epigenéticas, a qual sugerem contribuir para elucidar os mecanismos e os loci determinantes de fenótipos (Tsafaris et al. 2008; Johannes et al. 2009; Wu et al. 2013).

O aumento expressivo no peso das raízes da quimera demonstra seu grande potencial de aumento da produtividade e pode ser verificado a partir de um estudo detalhado de produtividade. Além disso, o porte aéreo vigoroso a faz útil para utilização como para cobertura, o que é de especial importância na integração com outros cultivos em sistemas agroflorestais, sistema muito utilizado para produção de mandioca em pequenas propriedades.

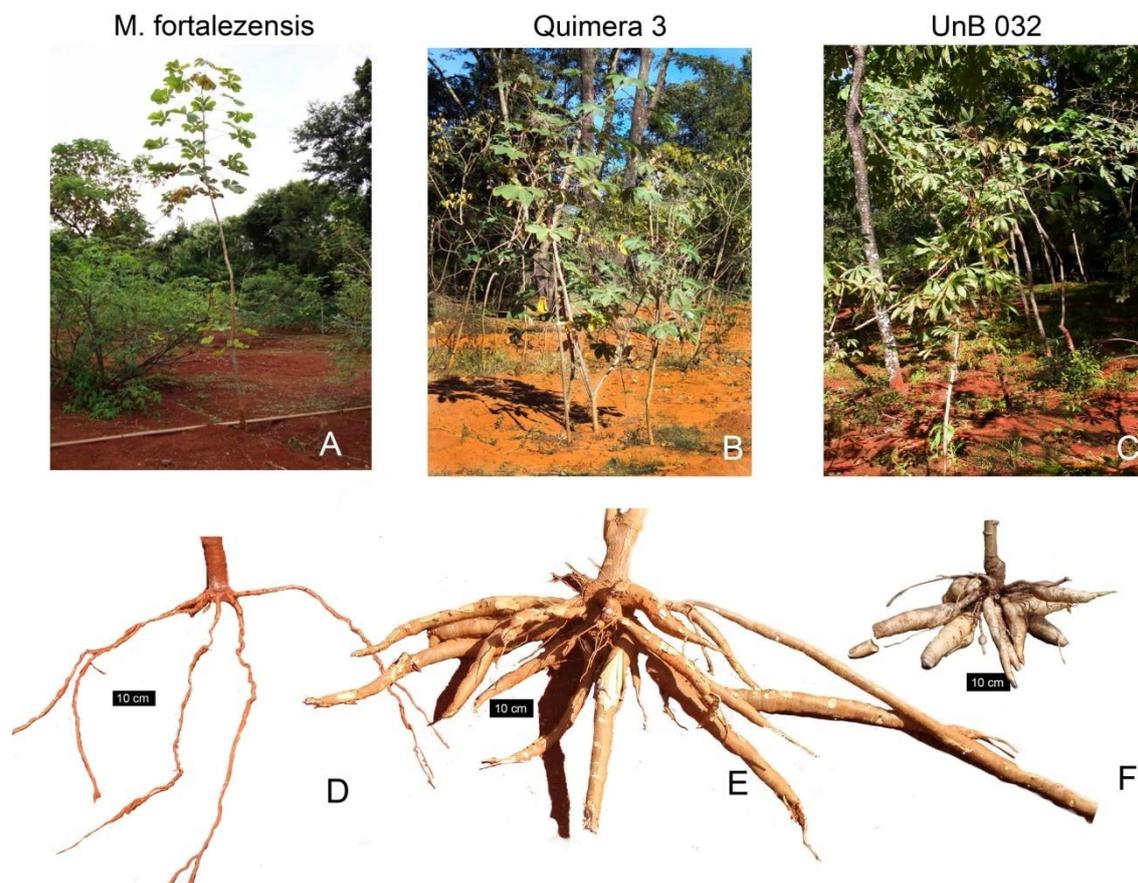


Figura 8 Planta inteira e raízes da Quimera 3 (centro) comparada às espécies parentais *M. fortalezensis* (esq) e *M. esculenta* da variedade UnB 032 (dir.): A: Arbusto ereto normalmente solitário, ca. 8m. B. Quimera 3: Arbusto semiereto ca. 4m, com ramificação. C. UnB 032: Arbusto ereto com ramificação ca. 2m.

A análise anatômica das raízes comprovou a constituição tuberosa em Quimera 3, isto é xilema essencialmente composto por células parenquimáticas cheias de amido, com distribuição e formato similares aos da variedade de mandioca UnB 032, exceto nas pequenas porções de parênquima axial. O formato dos grãos é circular, e o diâmetro médio é menor que na variedade UnB 032: grãos pequenos, $6,4 \pm 2,6 \mu\text{m}$, enquanto UnB 032 possui grãos médios com $15,3 \pm 4,4 \mu\text{m}$, seguindo-se a classificação de Lindeboom et al. 2004. Este menor tamanho dos grãos de amido da Quimera 3 são, além de muito palatáveis, apropriados para uso em materiais biodegradáveis e papéis finos, pois permitem uma hidrólise rápida (Lindeboom et al. 2004).

Tabela 3 Diâmetro dos grãos de amido da Quimera 3 comparada à variedade de mandioca UnB 032. Média seguida de desvio padrão, diâmetros mínimos e máximos.

	Diâmetro (μm)			
	Média	±	Mínimo	Máximo
Quimera 3	6,4	± 2,6	2,8	11,9
UnB 032	15,3	± 4,4	7,6	23,4

Identificação dos tecidos quimerais

Meristema apical caulinar

Uma quimera vegetal é um mosaico com células genotipicamente diferentes no meristema apical (Marcotrigiano 1997). O meristema apical da Quimera 3, não apresentou diferença de tamanho entre as camadas (Figura 9 A,B,C), o que é coerente com a pouca diferença de nível de ploidia entre elas (apenas 1n). Todas as camadas apresentaram o mesmo tamanho, o qual era semelhante ao de *M. fortalezensis*. Isso é esperado, uma vez, que o controle do tamanho das células da camada L1 não é autônomo, isto é depende do tamanho das células das camadas adjacentes (Savaldi-Goldstein et al. 2007; Marcotrigiano 2010).

Determinação da constituição da camada L1 através da investigação morfológica e anatômica de células epidérmicas

A ocorrência de asas nos frutos permitiu determinar a constituição da camada L1 (Tabela1), por que essa "característica diagnóstica" pertence à mandioca (Rogers; Appan 1973; Nassar et al. 1996).

Adicionalmente, características epidérmicas tais como formato, em vista paradérmica, e a largura das células comuns; a ocorrência de tricomas e o comprimento dos estômatos foram utilizados para determinar a constituição da camada L1, uma vez que são derivadas desta (Tabela 4) (Evert 2006; Satina et al. 1940; Goffreda et al. 1990; Marcotrigiano 2010)

O formato das células epidérmicas comuns, em vista paradérmica, se mostrou idêntico ao da variedade de mandioca UnB 032 e diferente do encontrado na espécie *M. fortalezensis* (Figura 9D,E,F), indicando a presença da variedade UnB 032 na epiderme.

Os tricomas foram encontrados apenas na variedade parental, UnB 032 (Figura 9G, H, I). Já na Quimera 3 haviam tricomas dispersos pela lâmina e sobre as nervuras, assim como a variedade UnB 032, o que denota a presença de tecido de UnB 032 na epiderme. No entanto, os tricomas estavam presentes em menor frequência na Quimera 3, o que demonstra uma provável interação da epiderme da mandioca com os tecidos internos da espécie não pubescente *M. fortalezensis*.

O comprimento dos estômatos na face abaxial foliar e a largura das células epidérmicas do pecíolo mostraram tamanhos intermediários aos das espécies parentais *M. fortalezensis* e *M. esculenta* (UnB 032), o que condiz com os tamanhos das células meristemáticas do ápice caulinar, uma vez que não foram observadas diferenças entre o tamanho das camadas. A ocorrência de tamanhos intermediários em células da epiderme pode ser atribuída à interação de tecidos das espécies, isto é dos tecidos triploides internos e diploide externo, pois o tamanho das células da epiderme é controlado também pelos tecidos internos (Savaldi-Goldstein et al. 2007; Marcotrigiano 2010).

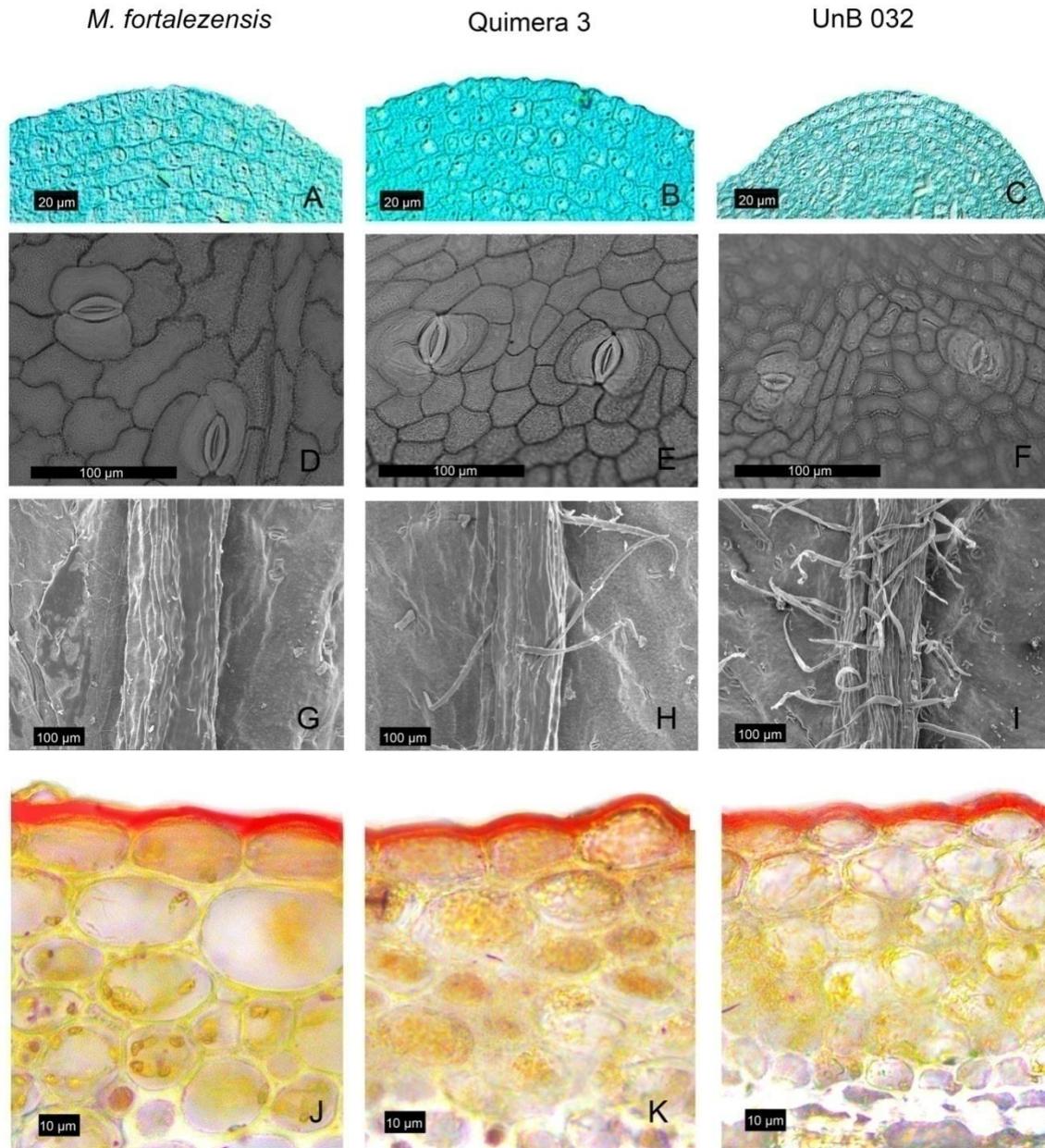


Figura 9 Características anatômicas da Quimera 3 comparada às espécies parentais: *Manihot fortalezensis* e *M. esculenta* variedade UnB 032. A, B, C: Meristema apical caulinar. Nenhuma diferença de tamanho entre camadas e tamanho semelhante ao de *M. fortalezensis*. D, E, F: Vista paradérmica da lamina foliar, formato das células da Quimera 3 semelhantes à UnB 032. Estômatos de tamanho intermediário aos dos parentais. G, H, I: Tricomas sobre as nervuras centrais. Quimera 3 apresenta tricomas assim como na UnB 032. J, K, L: Vista transversal do pecíolo. Células epidérmicas comuns de largura intermediária à dos parentais, todos possuem cutícula espessa.

Tabela 4 Caracterização da epiderme foliar (limbo e pecíolo) da Quimera 3 comparada às espécies parentais: *Manihot fortalezensis* e *M. esculenta* (variedade UnB 032), no 6º nó (comprimento do estômato, n=5; largura das células do pecíolo: n=4).

	<i>M. fortalezensis</i> (FFF)	Quimera 3 (EFF)	Variedade UnB 032 (EEE)
Células epidérmicas da folha Tamanho e forma (Fig. 9 D,E,F)	Células grandes com paredes anticlinais sinuosas.	Células de tamanho média com paredes anticlinais regulares.	Células pequenas com paredes anticlinais regulares.
Comprimento do estômato * (Fig. 9 D,E,F)	18.10 $\mu\text{m} \pm 1.643$ a	17.54 $\mu\text{m} \pm 2.167$ ab	14.73 $\mu\text{m} \pm 1.103$ b
Tricomas sobre a lâmina foliar (Fig. 9 G,H,I)	Ausente	Baixa frequência	Alta frequência
Epiderme do pecíolo	Quimera 3 e as espécies parentais mostraram epiderme não estratificada com paredes celulares e cutícula espessas. As espécies diferiram apenas em formato e largura.		
Formato da célula	Células tabulares à ovais frequentemente intercaladas por células isodiamétricas.	Células ovais à isodiamétricas.	Células isodiamétricas
Largura das células*	24 $\mu\text{m} \pm 4.636$ a	19,57 $\mu\text{m} \pm 2.5298$ ab	14,96 $\mu\text{m} \pm 1.4212$ b
Córtex do pecíolo	Tanto Quimera 3 como as espécies parentais tem tecido parenquimático intercalado por tecido colenquimático lamelar, com o mesmo número de camadas celulares (4-7 no parênquima mais externo, 3-5 no colênquima e parênquima interno). Diferença entre a quimera e os parentais foi notada no tamanho e formato das células do parênquima mais externo, e conteúdo do parênquima mais interno: ocorrência menos frequente de drusas de oxalato de cálcio no parênquima mais interno de <i>M. fortalezensis</i> .		
Parênquima mais externo Formato da célula Largura da célula*	Célula oval 29.70 $\mu\text{m} \pm 1.23$ a	Célula oval 21.93 $\mu\text{m} \pm 0.46$ b	Célula isodiamétrica 18.60 $\mu\text{m} \pm 0.39$ b
Colênquima Largura da célula*	20.37 $\mu\text{m} \pm 4.647$ a	13.79 $\mu\text{m} \pm 1.697$ b	13.16 $\mu\text{m} \pm 1.7291$ b
Parênquima mais interno Largura da célula* Conteúdo celular	32.98 $\mu\text{m} \pm 2.98$ a Drusas de oxalato de cálcio pouco frequente	30.42 $\mu\text{m} \pm 3.568$ a Drusas de oxalato de cálcio frequentes.	28.95 $\mu\text{m} \pm 0.9115$ a Drusas de oxalato de cálcio frequentes.
Endoderme	Há diferentes frequências de grãos de amido e de drusas de oxalato de cálcio entre as espécies.		
Conteúdo celular	Grãos de amido e drusas de oxalato de cálcio muito frequentes	Grãos de amido raros e drusas de oxalato de cálcio frequentes.	Grãos de amido e drusas de oxalato de cálcio raros.
Fibras pericíclicas	Fibras poligonais frequentemente gelatinosas		
Feixe vasculares	Feixes bicolaterais dispostos em anel, com laticíferos facilmente notáveis em <i>M. fortalezensis</i> . Houve diferença no conteúdo das células parenquimáticas do floema.		
Conteúdo celular	Drusas ausentes	Drusas ausentes	Drusas raras
Número de feixes vasculares	8	9 a 11	9 e 10
Xilema	A quimera e as espécies parentais possuíam xilema compostos por vasos do mesmo diâmetro, mas com número variado de raios de elementos de vaso		

Raios de elemento de vasos do xilema	7 a 10	6 a 8	5 a 8
Medula	Células poliédricas contendo grãos de amido e drusas de oxalato de cálcio próximo aos feixes, diferindo apenas em conteúdo celular.		
Conteúdo celular	Grãos de amido frequentes	Grãos de amido raramente notados	Grãos de amido raramente notados
	Drusas raramente notadas	Drusas frequentemente notadas	Drusas ausentes
* Médias e desvio padrão . Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias de acordo com o Teste de Tukey ($P \leq 0.05$).			

Constituição das camadas L2 e L3 elucidada pela análise citogenética

Contagens cromossômicas nos gametas permitiram determinar a constituição da camada L2, pois eles geralmente são derivados desta camada (Satina et al. 1940; Goffreda et al. 1990). As contagens metafásicas em células mãe do pólen mostraram $2n=54$ na Quimera 3, assim como em *M. fortalezensis* (Figura 10A e B). Enquanto na mandioca, UnB 032, era $2n=36$ (Figura 10C). Portanto, deduziu-se que esta camada é constituída por *M. fortalezensis*.

A contagem cromossômica em pontas de raízes adventícias permitiu determinar a constituição da camada mais interna L3, porque essas raízes se originam do periciclo derivado a partir da camada L3 (Evert 2006; Medina et al. 2007; Bomfim et al. 2011). Nessa contagem, foram notados 54 cromossomos, o que confirma a mesma ploidia da espécie silvestre parental *M. fortalezensis*.

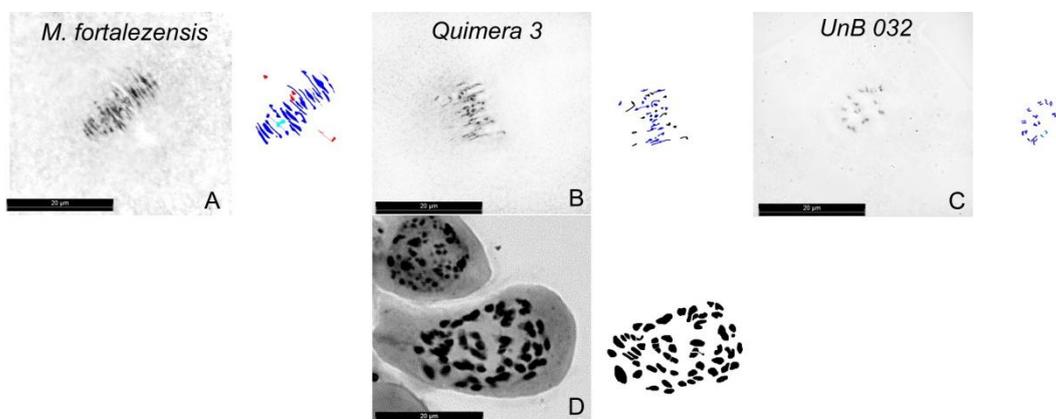


Figura 10 Número cromossômico na Quimera 3 (centro) comparado às espécies parentais *Manihot fortalezensis* (esquerda) e *M. esculenta* (direita), ao lado dos respectivos croquis. A, B, C: Metáfase I em células mãe do pólen (derivadas da camada L2); D.:Metáfase em célula meristemática da ponta de raiz (derivada da camada L3). Marcas azuis: bivalentes; pretas e vermelhas: univalentes. Barra: 20 μm .

Com base nessas análises, a constituição da Quimera 3 foi definida como EFF, o que representa L1, L2 e L3, respectivamente, sendo "E" para *M. esculenta* UnB 032, e "F" para *M. fortalezensis*. Julgando pela uniformidade de caracteres em toda a planta, deduziu-se que esta quimera apresenta um arranjo periclinal, onde toda a epiderme é constituída pela mesma espécie, *M. esculenta*.

Conclusão

Este resultado oferece método, técnica e material para outros pesquisadores a fim de combinar características de diferentes espécies e investigar profundamente a interação entre espécies. Este método é útil, especialmente, para combinar espécies dificilmente hibridizáveis como os triploides. A quimera mostrou ser um valioso material para estudo do mecanismo relacionado ao grande aumento das raízes, além de ser útil para a produção de mandioca.

Nós mostramos uma nova abordagem para o melhoramento da mandioca baseado na síntese de quimeras interespecíficas contendo tecidos das espécies cultivada e silvestre, o qual mostrou ter o potencial de melhorar significativamente a produção da cultura.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) por financiar esta pesquisa; ao *International Development Research Centre* (IDRC) por ajudar a estabelecer a coleção viva de espécies de *Manihot* na Universidade de Brasília, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) por fornecer bolsa de estudos para o 1º autor (NNB).

Referências

- Aversano, R., Caruso, I., Aronne, G., Micco, V. De., Scognamiglio, N., 2013. Stochastic Changes Affect *Solanum* Wild Species Following Autopolyploidization. *Journal of Experimental Botany* 64: 625-635.
- Bomfim, N. N., Graciano-Ribeiro, D.; Nassar, N. M. A., 2011. Genetic Diversity Of Root Anatomy In Wild And Cultivated *Manihot* Species. *Genetics and Molecular Research* 10: 544-51.
- Burge, G. K., Morgan, E. R.; Seelye, J. F., 2002. Opportunities For Synthetic Plant Chimeral Breeding : Past And Future. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 13-21.
- Ceballos, H., Iglesias, C. a, Pérez, J. C.; Dixon, A. G. O., 2004. Cassava Breeding: Opportunities And Challenges. *Plant molecular biology*, 56: 503-516.
- Chen, L.-P., Ge, Y.-M., Zhu, X.-Y.; Biology, C. 2006. Artificial Synthesis Of Interspecific Chimeras Between Tuber Mustard (*Brassica juncea*) And Cabbage (*Brassica oleracea*) And Cytological Analysis. *Plant Cell Reports* 25: 907–913.
- Evert, R. F., 2006. *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. 3th ed. John Wiley & Sons, Inc. 601pp.
- FAO., 2013. *Save And Grow: Cassava - A Guide To Sustainable Production Intensification*. (FAO, Ed.). 140 pp.

Goffreda, J. C., Szymkowiak, E. J., Sussex, I. M.; Mutschler, M. A. 1990. Chimeric Tomato Plants Show That Aphid Resistance And Triacylglyceride Production Are Epidermal Autonomous Characters. *The Plant Cell* 2: 643–649.

Johannes, F., Porcher, E., Teixeira, F. K., Saliba-Colombani, V., Simon, M., Agier, N., Colot, V., 2009. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS genetics* 5: e1000530. doi:10.1371/journal.pgen.1000530

Johansen, D. A., 1940. *Plant Microtechnique*. E. W. Sinott, Ed. McGraw-Hill. 523pp.

Kaddoura, R. L.; Mantell, S. H., 1984. Synthesis And Characterization Of *Nicotiana-Solanum* Graft Chimeras. *Annals of Botany* 68: 547-556.

Kraus, J. E.; Arduin, M. 1997. *Manual Básico De Métodos Em Morfologia Vegetal*. EDUR, Ed. Seropédica, RJ. 198pp.

Lindeboom, N., Chang, P. R.; Tyler, R. T. 2004. Analytical, Biochemical And Physicochemical Aspects Of Starch Granule Size, With Emphasis On Small Granule Starches: A Review. *Starch - Stärke* 56: 89-99.

Marcotrigiano, M., Gradziel, T.M., 1997. Genetic Mosaics And Plant Improvement. In: J. Janick (Ed.), *Plant Breeding Reviews*. Volume 15, John Wiley and Sons, Inc.

Marcotrigiano, M., 1997. Chimeras And Variegation: Patterns Of Deceit. *HortScience*, 32: 773-784.

Marcotrigiano, M., 2010. A Role For Leaf Epidermis In The Control Of Leaf Size And The Rate And Extent Of Mesophyll Cell Division. *American Journal of Botany* 97: 224-233.

Medina, R. D., Faloci, M. M., Gonzalez, A. M.; Mroginski, L. A. 2007. In vitro Cultured Primary Roots Derived from stem segments of cassava (*Manihot esculenta*) can behave like storage organs. *Annals of Botany* 99: 409-423.

Nassar, N. M. A.; Bomfim, N., 2013. Synthesis of Periclinal Chimera In Cassava. *Genetics and Molecular Research* 12: 610-617.

Nassar, N. M. A., Carvalho, C. G.; Vieira, C., 1996. Overcoming Crossing Barriers Between Cassava, *Manihot Esculenta* Crantz And A Wild Relative, *M. Pohlilii* Warwa. *Brazilian Journal of Genetics*, 19: 617–620.

Nassar, N. M. A.; Ortiz, R., 2009. Cassava Genetic Resources: Manipulation For Crop Improvement. In (J. Janick) Ed., *Plant Breeding Reviews*. Volume 31. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Nassar, N.; Ortiz, R., 2010. Breeding Cassava To Feed The Poor. *Scientific American* 302: 78-82, 84.

Nassar, N. M. A., Ribeiro, D. G., Bomfim, N. N.; Gomes, P. T. C., 2010. *Manihot fortalezensis* Nassar, Ribeiro, Bomfim Et Gomes A New Species of *Manihot* from Ceará, Brazil. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 831-835.

Paiva, J. G. A., Fank-de-Carvalho, S. M., Magalhães, M. P.; Graciano-Ribeiro, D., 2006. Verniz Vitral Incolor 500: Uma Alternativa De Meio De Montagem Economicamente Viável. *Acta Botanica Brasílica*, 20, 257–264.

- Rieseberg, L. H.; Carney, S., 1998. Plant Hybridization. *New Phytologist*, 140, 599–524.
- Rogers, D.J.; Appan, S.G., 1973. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae), *Flora neotropica*, monograph n. 13, Haffner, New York, NY. 272 pp.
- Satina, S., Blakeslee, A. F.; Avery, A. G., 1940. Demonstration Of The Three Germ Layers In The Shoot Apex of *Datura* By Means of Induced Polyploidy In Periclinal Chimeras. *American Journal of Botany* 27: 895–905.
- Savaldi-Goldstein, S., Peto, C.; Chory, J., 2007. The Epidermis Both Drives and Restricts Plant Shoot Growth. *Nature* 446: 199–202.
- Sreekumari, M. T., Jos, J. S.; Nair, S. G., 1999. “Sree Harsha”: A Superior Triploid Hybrid In Cassava. *Euphytica* 106: 1–6.
- Stewart, R. N., Meyer, F. G.; Dermen, H., 1972. Camellia Onto Daisy a Graft Chimera Of *Camellia Sasanqua* and *Japonica*. *American Journal of Botany*, 59: 515–524.
- Tsaftaris, A. S., Polidoros, A. N., Kapazoglou, A., Tani, E. and Kovačević, N. M., 2008. Epigenetics and Plant Breeding, in *Plant Breeding Reviews*. Volume 30, (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Ulukan, H., 2009. The Evolution Of Cultivated Plant Species: Classical Plant Breeding Versus Genetic Engineering. *Plant Systematics and Evolution*, 280: 133–142.
- Wu, R, Wang, X., Lin, Y., Ma, Y., Liu, G.,, 2013. Inter-Species Grafting Caused Extensive And Heritable Alterations of DNA Methylation In *Solanaceae* Plants. *PLoS ONE* 8: e61995. doi:10.1371/journal.pone.0061995
- Zhang, M., Deng, X., Qin, C., Chen, C., Zhang, H.; Liu, Q., 2007. Characterization Of A New Natural Periclinal Navel – Satsuma Chimera of Citrus: “Zaohong ” Navel Orange. *Journal of American Society of Horticultural Science* 132: 374–380.
- Zhou, J., Hirata, Y., Nou, I., Shiotani, H.; Ito, T., 2002. Interactions Between Different Genotypic Tissues in Citrus Graft Chimeras. *Euphytica* 126: 355–364.

Considerações finais

O conhecimento a respeito da biodiversidade vegetal ainda requer uma maior dedicação e talvez melhor catalogação da informação. No melhoramento de plantas, também é comum uma postura ainda negligente com as espécies silvestres, a quais constituem a biodiversidade vegetal. Ações que priorizem a conservação e estudos da caracterização ainda são uma urgência, pois a pouca utilização destas como fonte de variabilidade se deve em parte ao pouco conhecimento das espécies e locais de ocorrência.

A síntese de quimeras oferece a possibilidade de combinar características de diferentes espécies a favor da produção de alimentos de maneira menos interventiva, em termos genéticos, isto é com maior biossegurança, embora as recentes descobertas em relação à interação epigenética anunciem a ocorrência alterações herdáveis e transgeracionais, mas por processos naturais e comuns entre as espécies (Tsafaris et al. 2008¹). No entanto, as técnicas de formação de quimeras ainda requerem um melhor refinamento, o que logo será possível, frente aos atuais avanços como a impressão em 3D utilizando células de culturas de tecidos - o que já é possível com células animais, mas ainda em nível de estudo (Richards et al. 2013²). Adicionalmente, uma abordagem bioquímica, fisiológica e genômica fornecerão melhores resultados para a formação de quimeras como método de melhoramento de plantas através do efeito que a interação duas espécies na mesma planta.

Este trabalho demonstrou que, mesmo hoje, técnicas simples e antigas modernizadas, podem produzir resultados com grande impacto. A formação de quimeras oferece uma maneira relativamente mais rápida e previsível de combinação de espécies silvestres e espécies cultivadas, sendo assim uma técnica promissora de introdução de características vantajosas para o melhoramento em

¹ Tsafaris, A. S., Polidoros, A. N., Kapazoglou, A., Tani, E. and Kovačević, N. M., 2008. Epigenetics and Plant Breeding, in Plant Breeding Reviews. Volume 30, (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

² Richards, D. J., Tan, Y., Jia, J., Yao, H. and Mei, Y. (2013), 3D Printing for Tissue Engineering. *Israel Journal of Chemistry* 53: 805–814

diversas culturas. Estas vantagens são especialmente importantes no caso de culturas como a da mandioca, isto é, quando comparado ao método tradicional onde é necessário diversas gerações, e em algumas espécies pode levar décadas.

Por fim, estes resultados corroboram a importância das espécies silvestres para o melhoramento de espécies cultivadas. Culturas como a do café resistiram contra a ferrugem na década de 40 devido a contribuição de espécies silvestres (Carvalho 1986³), assim como a cultura da mandioca que foi salva na África na década de 70 graças á hibridização com uma espécie silvestre (*Manihot glaziovii* Muell. Arg.) resistente ao vírus do mosaico (IDRC 2010⁴). Esses exemplos servem para incentivar trabalhos que utilizem a síntese de quimeras para combinar diferentes espécies, especialmente as espécies silvestres às cultivadas, evitando-se os passos de retrocruzamentos necessários na hibridização sexual.

³ Carvalho, A., 1986. Pesquisas sobre o melhoramento do café. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, XLIII, pp.793–809.

⁴ IDRC, 2010. Better cassava boost food security. *IDRC Communications -Lasting impacts*.