

BIODIVERSIDADE e BIOTECNOLOGIA EM MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz).

Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília,DF.

INTRODUÇÃO:

A planta de mandioca ideal para todos nós mandioqueiros ainda esta por ser descoberta. Além do mais, temos uma ilusão criada pela nossa patética mente de em algum momento ter ordem e simplicidade na grande complexidade e diversidade encontrada nesta planta. Uma iniciativa simples e independente de reconhecimento do centro de domesticação desta planta na Amazônia e um retorno a este centro na busca de características indicadoras da síndrome de domesticação da mesma revelaram uma diversidade surpreendente de características agronômicas de grande potencial para trazer novas alternativas de uso desta cultura para Brasil e o Mundo. As informações apresentadas neste trabalho trazem o sumário dos resultados de pesquisas concebidas sob uma ótica inovadora com o uso de ferramentas biotecnológicas modernas.

Historicamente, a mandioca tem sido cultivada para a produção de farinha e amido convencional (mandioca para indústria de fécula), além do consumo direto na alimentação (mandioca de mesa). Em consequência, todas as coleções de germoplasma no Brasil e no Mundo e os programas de melhoramento foram orientados para alta produtividade regional através de estudos de adaptabilidade ambiental de variedades, resistências a fatores bióticos e abióticos, e elevada produção de matéria seca visando maior aproveitamento da fécula. Nossos estudos recentes, desenvolvidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, baseados na agrobiodiversidade desta planta no centro de origem e domesticação na Amazônia e orientados para busca de novas características para a melhoria da qualidade da raiz de reserva da mesma, trouxeram novas concepções tecnológicas para os programas de melhoramento e possibilidades de geração de novos produtos processados da raiz de reserva de mandioca. Nestes estudos foi organizada uma nova coleção de landraces com características incomuns, tais como mandiocas arredondadas (tipo batata), mandiocas açucaradas, mandiocas coloridas com diversidade nas formas carotenóides acumulados, e mandiocas coloridas com conteúdo protéico superior às mandiocas brancas. O centro de origem e domesticação foi reconhecido através de marcadores moleculares em estudos de filogenia. Uma nova classe de raiz de mandioca açucarada foi reconhecida através de caracterização bioquímica e genética molecular. Possíveis mutações espontâneas foram reconhecidas nas mandiocas coloridas com elevados teores específicos de licopeno, β -

caroteno, luteína e violaxantina reportadas pela primeira vez. Também, landraces com elevado conteúdo de proteínas foram observados em associação com os elevados conteúdos de carotenóides. Um modelo de desenvolvimento de raiz de reserva de mandioca foi estabelecido para estudos básicos de análises de expressão de genes. Novas alternativas de uso da cultura de tecido para conservação e intercâmbio de germoplasma pela produção de sementes artificiais de mandioca, e geração de ferramentas para estudos básicos de formação de raiz de reserva pela indução de formação de raiz de reserva em invitroplants foram também desenvolvidos.

Tradicionalmente, para várias culturas, inclusive mandioca, os melhoristas tem usado landraces, espécies próximas e espécies ancestrais como fonte de características para melhoramento genético de características de interesse agrônomo. O exemplo do arroz (*Oriza sativa*), durante a revolução verde, buscou na espécie progenitor (*Oriza rufipogon*) do arroz, genes resistentes a patógenos para incorporá-los nas cultivares de interesse agrônomo. Nosso trabalho com mandioca é centrado nas espécies nativas e na agrobiodiversidade da mandioca na Amazônia para busca e incorporação de genes de interesse em variedades comerciais. Ao longo dos últimos dez anos temos investigado os ancestrais silvestres da mandioca no centro de diversidade das espécies do gênero *Manihot* no Brasil, estudado as relações entre a mandioca e seu ancestral, estabelecido o centro de domesticação da mandioca no Sudoeste da Amazônia, caracterizado a agrobiodiversidade da mandioca na Amazônia e descoberto várias características da raiz de reserva da mandioca de extrema utilidade no melhoramento da qualidade nutricional e industrial desta planta. Com estes resultados podemos concluir que nossos estudos servem para identificação e descrição dos potenciais naturais de reservas de germoplasma para melhoramento da mandioca, além de eleger a mandioca como um modelo de planta para o entendimento do processo de evolução das espécies em um gênero de evolução recente e domesticação de espécies perenes de propagação clonal.

Finalmente, em complemento a estes estudos, através das observações de uso local da mandioca na Amazônia, foram também identificados várias possíveis alternativas de uso da agrobiodiversidade que podem vir a ser transformados em produtos comerciais. Como exemplo, podemos citar o xarope de glicose obtido de mandioca açucarada que não necessita do processo de hidrólise do amido, picles de mandiocas coloridas, concentrado de carotenóides em pó (produto semelhante ao Tucupi comercial) rico em carotenoid pro Vitamita A.

SISTEMÁTICA DO GENERO *Manihot*: PARENTES PROXIMOS DA MANDIOCA.

Manihot (Euphorbiaceae) é um gênero do Neotropico com 98 espécies com plantas que variam de herbáceas a arvores. É reconhecido dois centros de diversidade de espécies, um no Brasil com 80 especies e outro no México. Quatro principais centros de diversidade de espécies são reconhecidos no Brasil. O Planalto Central (altitude superior 1000m) é o que tem maior numero de espécies (58 das 80) seguido do Nordeste (8 em 80), Sudeste (8 em 80) e a Amazônia (6 em 80) como o centro de maior diversidade da mandioca e seu ancestral. A taxonomia de *Manihot* é um enigma devido a superposição dos caracteres morfológicos entre as espécies, da plasticidade fenotipica destes caracteres, da falta de variação no numero de cromossomos entre as espécies e do numero limitado de caracteres com informação taxonômica. A falta de caracteres morfológicos confiáveis dificulta os estudos sobre a origem da mandioca e em consequência varias espécies de *Manihot* originadas do México, América Central e América do Sul podem ser ancestrais potenciais da mandioca. As duas hipóteses de origem da mandioca sugerem que a mandioca é uma espécie hibrida (cultigen) que se fundamenta no complexo de espécies Mexicanas ou uma espécie oriunda de uma única especie ancestral que se fundamenta no complexo das espécies de *Manihot* que ocorrem no Brasil, sendo a *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* esta espécie.

Estas duas hipóteses foram testadas, inicialmente em nosso trabalho, através de estudos de filogenia molecular das espécies do gênero para conhecermos relações entre as espécies de *Manihot*. Os resultados deste trabalho indicaram que (a) - em geral ocorre uma elevada similaridade na sequência do locus de DNA ribossomal (IST) entre as espécies deste gênero, o que corrobora com a hipótese de uma evolução recente deste genero; (b) - que o gênero *Manihot* é um gênero de evolução recente, o que é também evidente pelas observações de caracteres morfológicos e de falta de diferenciação de numero de cromossomos entre as espécies deste gênero; (c) – na maioria das vezes, a relação entre as espécies não foi totalmente resolvida pelo locus testado, indicando politomia na arvore filogenética; (d) – em todos os casos de testes de outros locus genomicos geraram uma arvore filogenética com duas linhagens de espécies, sendo uma de origem Mexicana e outra de origem Brasileira; (e) – em todos os casos testados, a mandioca ficou característico como pertencente a linhagem de espécies da América do Sul; (f) - finalmente, foi observado uma elevada identidade das sequências dos locus estudados entre a mandioca e a *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia*

Finalmente, podemos concluir que estas informações suportam a hipótese de Antonio Costa Allem baseada em caracteres morfológicos e fundamentos de sistemática clássica alem

de nos direcionar para examinar a mesma para estudos de populações naturais de *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* como o ancestral da mandioca.

ANCESTRAL DA MANDOCA:

Manihot esculenta subsp. *flabellifolia* ocorre na zona de transição entre a floresta Amazônica e o Cerrado na região limítrofe do Peru e Brasil em vegetação de galeria associada a rios ocorrendo em populações também associadas ao desmatamento da floresta. A *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* cresce na forma de cipós sem raiz de reserva sobre a copa das árvores e com a retirada da floresta se rebrota na forma de um arbusto robusto com raiz de reserva rudimentar fibrosa. Vinte sete destas populações foram estudadas com dois tipos de marcadores genéticos (lôcus do gene *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* - *G3pdh*, e cinco lôcus de *Microsatelites*). O locus *G3pdh* foi analisado para se inferir sobre as informações históricas e o processo evolutivo da mandioca, e sistematizar linhagens de distribuição geográfica. Os lôcus de microsatelites foram analisados para se obter informações sobre variações entre as populações e a diversidade genética. Os resultados destas pesquisas indicaram que: (a) – a análise comparativa destes dois tipos de marcadores moleculares documentam que a *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* é de fato o ancestral da mandioca e que o Sudoeste da Amazônia é um sitio geográfico de domesticação da mandioca; (b) – a árvore filogenética construída com bases nas relações de mutações em haplotipos com substituição simples de nucleotídeos no gene *G3pdh* indicam a descendência da mandioca através da *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* corroborando com a hipótese da existência de um ancestral simples; (c) – a mandioca contém haplotipos idênticos em menor numero na mandioca que na *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* o que fortalece também a hipótese do ancestral; (d) – o estudo com microsatelites indicam que a mandioca é um subgrupo (15 dos 73 alelos analisados em *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* existem na mandioca) dentro das populações naturais de *M. esculenta* subsp. *flabellifolia*; (e) – os dados de microsatelites e do gene *G3pdh* são concordantes.

Finalmente podemos concluir que através das análises de duas séries de dados de natureza independentes confirmam que a mandioca foi domesticada originalmente da espécie *M. esculenta* subsp. *flabellifolia*, e que o Sudoeste da Amazônia é o centro geográfico da origem da mandioca. Em complemento a esta afirmativa, outras evidências tanto do complexo agrícola desta região no passado como estudos arqueológicos corroboram nesta conclusão.

CARACTERS MORFOLÓGICOS ASSOCIADOS À DOMESTICAÇÃO DA MANDIOCA:

Distinções morfológicas entre o ancestral da mandioca na natureza e os cultivares modernos nos permitiram as seguintes especulações sobre a síndrome de domesticação ao longo de evolução da mandioca. Estas especulações foram sistematizadas dentro dos conceitos de ocorrência por efeitos ambientais causando mudanças no habito de crescimento diferenciado entre estas espécies, por efeitos de escolha da planta pelo uso da raiz de reserva e finalmente por consequência do processo de propagação vegetativa causando uma reduzida capacidade de floração e formação de sementes nos cultivar moderna. A espécie ancestral da mandioca (*Manihot esculenta* subsp *flabellifolia*) cresce na forma de trepadeira (cipó) no seu ambiente natural e não produz raiz de reserva comestível, com a remoção da floresta, uma nova população de plantas idênticas surge pela rebrota e/ou germinação de sementes na forma de arbusto e com formação de raiz de reserva com pequena quantidade de amidos e muita fibra. Uma segunda observação é que pela escolha de uma raiz de reserva com maior quantidade de amido, menor quantidade de fibra e variantes na coloração da mesma indica os eventos iniciais da síndrome de domesticação. Uma terceira observação refere-se a uma reduzida capacidade de floração e produção de sementes das cultivar modernas em relação a grande capacidade de floração da planta ancestral. Por esta observação podemos inferir que este fato se deve à longa historia de propagação vegetativa esta planta e escolha das mesmas por melhor raiz de reserva por populações primitivas na Amazônia.

Estas mudanças têm profundas implicações sob as coleções de germoplasma organizadas no Brasil e no Mundo. Por exemplo, a maioria das coleções de germoplasma no Brasil e no Mundo é organizada com bases na coleta de landraces locais com poucos acessos derivados de cruzamentos feitos pelo homem nos programas de melhoramento convencionais. Consequentemente a maioria dos programas de melhoramento são baseados na seleção massal de landraces devido a dificuldade de se obter cruzamentos desejados com parentais específicos devido ao habito de floração entre estas landraces. Adicionalmente, é observado uma forte dose de genótipos letais devido a auto polinização destas landraces.

Finalmente, é quase certo que uma serie particular de genes para cada um dos caracteres relatados acima tenham sido modificados devido a domesticação da especie ancestral da mandioca causando aquelas mudanças na espécie cultivada atualmente. Analises de QTL destes caracteres associados a analises de expressão gênica poderiam identificar o numero de genes responsáveis pela domesticação da *Manihot esculenta* subsp *flabellifolia* em *Manihot esculenta* subsp *esculenta* que é a espécie cultivada.

AGROBIODIVERSIDADE DA MANDIOCA NA AMAZONIA:

Com o conhecimento e as hipóteses relatados acima, de que a mandioca foi domesticada no Sudoeste da Amazônia e a identificação de possíveis caracteres indicadores do processo de domesticação, poderíamos esperar que a mais distante associação do homem com esta planta tenha sido nesta região. Adicionalmente, inúmeros cientistas visitantes nesta região têm observado usos diferenciados da mandioca por populações locais. Alimentos a base de mandioca são preparados incluindo farinhas, bijus, tapiocas, bebidas fermentadas e até folhas que são moídas e cozidas além de inúmeras outras utilizações são observados. Esta diversidade de cultivo e usos da mandioca, nestes locais, contrasta com o resto do mundo onde a mandioca é usada principalmente para produção de fécula. Na Amazônia, a mandioca é cultivada em pequena escala em sistemas agrícolas também diferenciados do resto do mundo que cultiva mandioca em larga escala na forma de mono cultura. Estas diferenças de cultivo e uso desta planta nos diferentes regimes agrícolas trazem consequências ao melhoramento por preferências e necessidades das características agrônômicas adotadas nos diferentes sistemas agrícolas. Consequentemente é esperado que a Amazônia tenha maiores variabilidades em características agrônômicas chaves que seriam úteis aos desafios de cultivo e utilização modernos desta planta pela sociedade atual. A descoberta do local geográfico da domesticação da mandioca, descrito acima, trazem contribuições imprecedentes no foco das pesquisas desta planta e das áreas de estudos e coleta de germoplasma. De fato, esta foi a concepção original das pesquisas que iremos apresentar nesta conferencia.

Viagens de coletas para a Amazônia forem organizadas para os estados de Mato Grosso, Rondônia, Amazonas, Para, Ilha de Marajo e Amapá na busca desta agrobiodiversidade focalizando características na raiz de reserva. Locais como pequenas propriedades rurais, comunidades isoladas, sistemas de cultivo diferenciados, mercados locais e regionais, juntamente com entrevistas com a comunidade foram procedidas. Testes de campo para presença de amidos raros e açúcares, bem como observações de coloração das raízes de reservas foram aplicados nas landraces locais que mostraram uma surpreendente variabilidade genética.

Quantificações de açúcares livres revelaram uma nova classe de mandioca denominada mandioca açucarada devido ao elevado teor de glicose presente na raiz de reserva das mesmas, bem como variantes nas proporções de amilose/emilopectina e a presença de amido tipo glicogênio. Varias destas landraces foram domesticadas para usos específicos nestas localidades. Por exemplo, a landrace com presença de amido tipo glicogênio é utilizada

na alimentação de bebês. O glicogênio é uma molécula organizada de cadeias pequenas de glicose com elevada ramificação em sua estrutura que lhe dá a propriedade de ser solúvel em água fria, o que contrasta com a amilopectina normal que ocorre nas cultivares comerciais. Outros exemplos podem também ser observados tais como o preparo de sobremesas com esta mandioca açúcarada e a fermentação no preparo de bebidas alcoólicas em cerimônias religiosas.

As landraces destas localidades, também variam na pigmentação da raiz de reserva com variantes de cor associadas à presença de carotenóides específicos tais como β -caroteno, luteína, xantofilas e licopeno. Estas variantes encontradas contrastam com os acessos de mandiocas depositadas em coleções de germoplasma no Brasil e no Mundo pela quantidade de β -caroteno e a presença de outros carotenóides não relatados anteriormente. Esta nova diversidade, em quantidade e tipos de carotenóides presentes na raiz de reserva de mandioca, abre um novo potencial para melhoramento da mandioca como fonte de alimentos que combina o suprimento de macronutrientes (amido) e micronutrientes (carotenóides). Surpreendentemente, foi também observado que os elevados acúmulos de carotenóides nas raízes destas landraces são também associados a um maior conteúdo de proteínas (40%) quando comparados com as mandiocas brancas. Estas descobertas abrem uma nova avenida de pesquisa na melhoria do teor de proteínas na raiz de reserva desta planta. Novamente várias destas landraces, podem ter sido domesticadas para usos específicos na culinária local. Por exemplo, o suco de mandiocas amarelas (TUCUPI) é vendido nos mercados locais para preparo de pratos da culinária regional da Amazônia.

Finalmente, nossas pesquisas atuais estão explorando os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e genéticos destas variantes usando as tecnologias modernas tais como biotecnologia, PROTEOMICS e TRANSCRIPTOMICS para identificar mutações espontâneas tais como a mandioca açúcarada com amido *waxy*, mandioca açúcarada com glicogênio, e mandiocas coloridas com somente licopeno e β -caroteno. Podemos também especular que a existência destas mutações, como um processo natural de ocorrência, que quando identificadas por povos primitivos tenham sido selecionadas para elevar o conteúdo destes compostos específicos.

FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS E A BIODIVERSIDADE DA MANDIOCA:

Para acelerar o desenvolvimento e utilização da tecnologia da genômica funcional em mandioca, é necessário o desenvolvimento de ferramentas moleculares, definirem os recursos genéticos e processos biológicos que possam alcançar um produto desejado. Mutações espontâneas têm sido usadas para dissecar rotas metabólicas de interesses, tais como amidos e carotenóides que levem ao acúmulo de destes produtos úteis na nutrição e saúde humana. Em plantas de propagação vegetativa, que acumulam estes produtos em órgãos subterrâneos como raiz de reserva de mandioca, estas rotas metabólicas tem sido pouco estudadas e faltam informações necessárias em vários aspectos. Mutantes trazem informações críticas para o isolamento de genes usando-se ferramentas de genômica funcional. Os resultados, descritos acima sobre a agrobiodiversidade da mandioca nos levaram a descoberta de novos germoplasma de mandioca que possuem características agrônômicas desconhecidas em germoplasma de mandiocas comerciais. Esta diversidade genética esta sendo utilizada para desenvolver ferramentas de genômica funcional comparativa tais como bibliotecas de cDNA (seis bibliotecas subtrativas), data base de EST (>1200 entradas), um mapa de gel de 2-DE e um banco de dados (> 100 entradas) para proteínas associadas a cromoplasto, clonagem de cDNA que codificam para genes que codificam para enzimas na rota metabólica de sacarose-amido (sete cDNA) e carotenóides (oito cDNA). Com estas ferramentas esperamos promover uma distribuição igualitária socialmente dos benefícios da biotecnologia moderna alem de modernizar as estratégias dos programas de melhoramento de mandioca. Na atualidade, os programas de melhoramento de mandioca no Brasil estão focalizados no desenvolvimento de variedades como o único produto de tais programas. Estratégias modernas, incluindo o uso da biotecnologia, podem gerar outros produtos nestes programas, tais como patentes de genes e processos, tecnologias de novas alternativas de uso e apropriação dos nossos recursos genéticos com ferramentas de identificação dos mesmos incontestáveis.

Outras ferramentas biotecnológicas incluem a cultura de tecidos que vem sendo utilizada em nosso programa de pesquisa para gerar semente artificial de mandioca para fins de conservação e intercambio de germoplasma e um sistema de indução de raiz de reserva em condições in vitro para atender as necessidades de pesquisas básicas do processo de formação de raiz de reserva.

CONCLUSÕES

Os resultados, que inicialmente tinham caráter acadêmico, provaram também ser de grande utilidade prática. Primeiro tais resultados servem para fortalecer a hipótese de origem da mandioca como sendo Brasileira. Segundo identifica um provável centro de domesticação da mandioca no Sudoeste da Amazônia. Terceiro confirma e identifica a espécie ancestral da mandioca como sendo a espécie *M. esculenta* subsp. *flabellifolia*. Quarto populações naturais da espécie ancestral juntamente com landraces primitivas e variantes de germoplasma derivados da seleção massal podem contribuir nos estudos dos processos de domesticação de espécies de propagação vegetativa. Quinto, ao focar expedições de coletas na Amazônia para características específicas de uso no melhoramento genético, podemos ampliar e diversificar o uso da cultura da mandioca no Brasil e em outras partes do Mundo. Adicionalmente, esta estratégia também oferece oportunidades para o entendimento de vários processos biológicos estabelecidos por mecanismos genéticos variados que vão desde a ocorrência na natureza até os mecanismos controlados. A mandioca açúcarada pode servir como uma nova matéria-prima da mandioca para atender o pequeno produtor e seus padrões de vida. As mandiocas coloridas oferecem à humanidade uma nova alternativa de fonte de alimentos que combina o suprimento de macronutrientes (amido) e micronutrientes (carotenóides) em uma mesma fonte de alimento. Desafortunadamente, tanto as populações nativas de *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* e as landraces tradicionais estão desaparecendo em seus locais de origem pelos usos da agricultura moderna. Isto estabelece que a conservação da agrobiodiversidade da mandioca na Amazônia deve ser prioridade nos temas de pesquisas no Brasil, visto o valor e os benefícios potenciais dos recursos genéticos da mandioca neste país.