

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**SERLI DE OLIVEIRA CABRAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANATÔMICA E FISIOLÓGICA DE  
GENÓTIPOS DE *Manihot esculenta* (Crantz) COM SUBSESSILIDADE FOLIAR**

**ALEGRE, ES**

**2023**

**SERLI DE OLIVEIRA CABRAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANATÔMICA E FISIOLÓGICA DE  
GENÓTIPOS DE *Manihot esculenta* (Crantz) COM SUBSESSILIDADE FOLIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. André da Silva Xavier

Coorientadora: Dra. Laiane Silva Maciel

Coorientadora: Dra. Thamyres Cardoso da Silveira

**ALEGRE, ES**

**JULHO–2023**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANATÔMICA E  
FISIOLÓGICA DE GENÓTIPOS DE *Manihot esculenta* (Crantz) COM  
SUBSESSILIDADE FOLIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 14 de Julho de 2023

**Comissão Examinadora:**

**Prof. Dr. André da Silva Xavier (UFES)**

Orientador e Presidente da Comissão  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Flores Ferreira (UFES)**

Examinadora Interna  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

**Prof. Dr. Wagner Campos Otoni (UFV)**

Examinador Externo  
Universidade Federal de Viçosa

---

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Dr. André da Silva Xavier, meu orientador e professor, pela imensa dedicação, apoio e paciência durante todo o percurso dessa jornada acadêmica. Quero também agradecer de coração à Dra. Laiane Silva Maciel, minha coorientadora, pelo carinho, paciência e tranquilidade que me proporcionou ao longo desse caminho, assim como à Dra. Thamyres da Silveira, pela disponibilidade e atenção que sempre demonstrou.

Não posso deixar de expressar meu sincero agradecimento aos colegas que me auxiliaram no trabalho de campo - Pedro, Leo Mardgan e Gabriel Emerick- por toda a ajuda e suporte que me ofereceram. E ao Wilian Rodrigues, meu sincero agradecimento pela valiosa contribuição nas análises estatísticas;

Gostaria também de expressar minha gratidão aos professores Dr. Francisco Amaral e Dr. Marcelo, que prontamente nos emprestaram os equipamentos necessários para as análises fisiológicas;

Aos meus queridos colegas de bancada do Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA) - em especial Rafael Lara, Vanessa Sessa, Dalila da Costa e Lucas Gava - gostaria de agradecer o apoio nos momentos difíceis, bem como pelas risadas e brincadeiras compartilhadas;

À Dra. Profa. Márcia Flores, expressei minha sincera gratidão pelo suporte e ajuda inestimável no início das minhas análises;

Não posso deixar de agradecer à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e a todos os professores, tanto do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFES, quanto de fora dele, que contribuíram imensamente para o meu aprendizado, seja por meio do ensino formal ou da troca de experiências, Dr. Adésio Ferreira, Dra. Cíntia Bento, Dra. Tatiana Carrijo e Dr. Willian Bucker;

Quero aproveitar para agradecer aos colegas e técnicos do Departamento de Fitopatologia, em especial aos técnicos Lauana Pellanda e Carlos, que contribuíram indiretamente para o sucesso deste trabalho;

A Embrapa Mandioca e Fruticultura (EMBRAPA) pelo fornecimento das manivas-semente dos genótipos utilizados para fins de comparação neste trabalho e por outras parcerias que ainda seguem em curso, em especial ao Dr. Dimmy Barbosa e ao Dr. Éder de Oliveira;

Gostaria de expressar minha gratidão ao meu amigo Sílvio (PRETO) e ao seu irmão, agricultores e fornecedores do genótipo principal desta pesquisa. Sem a colaboração deles, essas investigações não teriam sido possíveis;

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento deste projeto e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFES pelo suporte prestado, em especial à secretária Fernanda, pela constante disponibilidade e carinho;

E por fim, mas não menos importante, não posso deixar de agradecer ao meu esposo e amigo Gilberto Silva Santos pela paciência e companheirismo constantes. Também quero expressar minha gratidão às minhas irmãs pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida. Somos verdadeiramente "as meninas superpoderosas".

## RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta*), popularmente conhecida como aipim, é amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais e é uma das principais culturas alimentares. Há um crescente interesse em melhorar a mandioca para aplicação industrial, como a produção de biocombustíveis e etanol, tornando os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) essenciais para a conservação e seleção de genótipos com características agrônômicas e industriais desejáveis. Um aspecto pouco explorado é o fenótipo de subsessilidade foliar, presente em certos genótipos de mandioca. A hipótese é que esses genótipos podem oferecer vantagens em condições de campo devido ao pecíolo reduzido, o que pode resultar em uma distribuição mais eficiente de fotoassimilados e, conseqüentemente, melhorar a produtividade. Essa característica pode ser explorada no desenvolvimento de variedades mais produtivas e resistentes, utilizando técnicas de edição gênica. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar, descrever e comparar dois genótipos de mandioca com o fenótipo de subsessilidade foliar em níveis molecular, anatômico e fisiológico. As análises moleculares, anatômicas e fisiológicas forneceram informações valiosas, aprimorando o entendimento das implicações desse fenótipo. Os resultados das características observadas no campo e fisiológicas indicam que a subsessilidade foliar nos genótipos M1 e M2 influencia a arquitetura do dossel da planta, resultando em uma configuração do tipo "bouquet" com sobreposição de folhas. Essa configuração demonstrou maior eficiência na captação de luz, com maior teor de clorofila *a* e *b*, sugerindo maior potencial fotossintético e possivelmente uma maior densidade de plantas por hectare. Além disso, foi identificado um gradiente de crescimento exclusivo nesses genótipos subsésseis que requerem investigações mais detalhadas sobre os fatores hormonais envolvidos nesse processo. As análises moleculares revelaram que, apesar das semelhanças nos padrões fenotípicos, não foi identificado um padrão específico de *background* genético associado ao fenótipo de subsessilidade foliar, indicando que essa variação pode ocorrer espontaneamente em qualquer genótipo ou variedade. Além disso, foram observadas diferenças notáveis na anatomia dos pecíolos curtos estabilizados, com a presença de uma estrutura *shell-like*, circundada por células do parênquima de preenchimento/fundamental e a ausência de câmbio. Esses resultados sugerem que a variação encontrada nos genótipos com subsessilidade foliar pode estar associada a respostas diferenciais a fatores edafoclimáticos, mas são necessários ensaios complementares para uma explicação mais completa. A compreensão dos fatores genéticos que controlam esse fenótipo é fundamental para o melhoramento genético da cultura.

Pesquisas adicionais no nível do transcriptoma e proteoma desses genótipos podem contribuir para mapear os fatores genéticos responsáveis pelo fenótipo de subsessilidade, abrindo caminho para a expansão das potencialidades dessa cultura através de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs).

**PALAVRAS-CHAVE:** Mandioca. Melhoramento genético. Pecíolo. Fisiologia vegetal. Mutações.

## ABSTRACT

The cassava (*Manihot esculenta*), commonly known as yuca or manioc, is extensively cultivated in tropical and subtropical regions and is one of the primary food crops. There is a growing interest in improving cassava for industrial applications, such as the production of biofuels and ethanol, making Active Germplasm Banks (AGBs) essential for conserving and selecting genotypes with desirable agronomic and industrial characteristics. One aspect that has been relatively unexplored is the foliar subsessility phenotype, which is present in certain cassava genotypes. The hypothesis is that these genotypes may offer advantages in field conditions due to their reduced petiole size, leading to a more efficient distribution of assimilates and, consequently, improved productivity. This characteristic can be leveraged in the development of more productive and resistant varieties using gene editing techniques. The objective of this research was to characterize, describe, and compare two cassava genotypes with the foliar subsessility phenotype at the molecular, anatomical, and physiological levels. Molecular, anatomical, and physiological analyses provided valuable information, enhancing the understanding of the implications of this phenotype. The results from field and physiological observations indicate that foliar subsessility in genotypes M1 and M2 influences the plant's canopy architecture, resulting in a "bouquet" configuration with overlapping leaves. This configuration demonstrated higher light capture efficiency, with higher levels of chlorophyll *a* and *b*, suggesting greater photosynthetic potential and possibly a higher plant density per hectare. In addition, a unique growth gradient was identified in these subsessile genotypes that require more detailed investigations into the hormonal factors involved in this process. Molecular analyses revealed that, despite similarities in phenotypic patterns, no specific background genetic pattern was identified associated with the foliar subsessility phenotype, indicating that this variation may occur spontaneously in any genotype or variety. Furthermore, notable differences were observed in the anatomy of stabilized short petioles, including the presence of a shell-like structure surrounded by filling/fundamental parenchyma cells and the absence of cambium. These results suggest that the variation found in genotypes with foliar subsessility may be associated with differential responses to edaphoclimatic factors, but further complementary assays are needed for a more comprehensive explanation. Understanding the genetic factors that control this phenotype is crucial for the genetic improvement of the cassava crop. Additional research at the transcriptome and proteome levels of these genotypes can contribute to mapping the genetic factors responsible for the subsessility



phenotype, paving the way for expanding the potential of this crop through Innovative Techniques in Precision Breeding (ITPBs).

**KEYWORDS:** Cassava. Genetic breeding. Petiole. Plant physiology. Mutations

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Descrição dos genótipos usados no estudo

**Tabela 2** Lista dos oligonucleotídeos usados no trabalho

**Tabela 3** Quantificação dos fragmentos amplificados com os marcadores moleculares rep-PCR e IRAP-PCR para a espécie *M. esculenta*

**Fig. 1** Caracterização fenotípica de seis genótipos de *M. esculenta* contrastantes para a característica de crescimento peciolar em folhas expandidas. (A) Imagens representativas dos grupos de genótipos com pecíolo curto (M1 e M2) e pecíolo longo (C4 e C2). (B) Imagem representativa da morfologia do pecíolo curto. (C) Média fenotípica do comprimento do pecíolo nos genótipos M1, M2, C1, C2, C3 e C4 cultivados em campo por seis meses. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de três repetições biológicas e cinco repetições técnicas. Nível de significância teste Scott-Knott, p-value 0,05

**Fig. 2** Dendrograma de seis genótipos de *M. esculenta* contrastantes para o fenótipo de subsessilidade foliar obtido a partir da análise de marcadores moleculares rep-PCR. (A) Perfil de bandas amplificadas com cada um dos marcadores (REP, BOX, ERIC). (B) Índice de dissimilaridade de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA

**Fig 3** Dendrograma de seis genótipos de *M. esculenta* contrastantes para o fenótipo de subsessilidade foliar obtido a partir da análise de marcadores moleculares IRAP. (A) Perfil de bandas amplificadas com cada um dos marcadores (AYF3, AYF5, AYF8 e AYF9). (B) Índice de dissimilaridade de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA

**Fig. 4** Caracterização fenotípica do gradiente de crescimento peciolar dos genótipos contrastantes M1, M2 e C4. (A) Imagem ilustrativa para representar os pecíolos que foram avaliados em cada nó. (B) Perfil do gradiente de crescimento peciolar até a completa estabilização do fenótipo de subsessilidade nos genótipos M1 e M2. As plantas foram cultivadas em solo e as medições foram conduzidas 28 dias após as primeiras brotações. O experimento foi realizado com três repetições biológicas e três repetições técnicas. (C) Arquitetura do dossel do genótipo M1, caracterizada como tipo ‘bouquet’. (D) Arquitetura do dossel do genótipo M2. (E) Imagem comparativa para representar as diferenças morfológicas entre o genótipo de pecíolo curto (M1) e pecíolo longo (C4)

**Fig. 5** Secção transversal de microestruturas do pecíolo nos genótipos M1, M2 e C4. (A) Representação esquemática do perfil do gradiente de subsessilidade foliar. PL: pecíolo longo. PI: pecíolo intermediário. PC: pecíolo curto. Genótipos analisados (B) M1, (C) M2 e (D) C4.

Ep:epiderme. Co:colênquima. Fv: Feixes vasculares. Fl:floema. X:xilema. M:medulla. Cv:câmbio vascular. Pc:parênquima cortical

**Fig. 6** Secção transversal de microestruturas da nervura foliar central e lâmina foliar nos genótipos M1, M2 e C4. (A) Representação esquemática dos pontos de coleta. NCF: nervura central foliar. LF: lâmina foliar. Genótipos analisados (B) M1, (C) M2 e (D) C4. Est: estômato. Pp: parênquima paliçádico. Pl: parênquima lacunoso. Ep: epiderme. Co: colênquima. Fv: feixes vasculares. Ps: papilas

**Fig. 7** Determinação dos índices de clorofila, flavonoídes e balanço de nitrogênio em genótipos contrastantes para o desenvolvimento peciolar. As análises foram conduzidas em plantas com quatro meses de idade cultivadas em campo experimental. Imagens representativas das plantas em campo experimental (A) genótipo M1 e (B) genótipo C4. Média dos índices fisiológicos (C) Índice de clorofila total (ChT). (D) Índice de clorofila *B* (Ch*B*). (E) Índice de flavonoídes (Flav). (F) Índice de clorofila *A* (Ch*A*). (G) Relação do índice de clorofila *A*/ índice de clorofila *B* (Ch*A*/Ch*B*). (H) Índice do balanço de nitrogênio. Nível de significância teste de Tukey, p-value 0,05

**Fig. 8** Análise da temperatura foliar mínima e máxima dos genótipos (A) M1, (B) M2 e (C) C4. As análises de temperatura foliar foram conduzidas em plantas com quatro meses de idade. (B) Gráfico com as médias obtidas da temperatura máxima foliar de cada genótipo. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de três repetições biológicas e cinco repetições técnicas. Nível de significância teste Scott-Knott, p-value 0,05

**Fig. S1** Comparativo da senescência das folhas C4 e M2. Imagem (A) folhas caídas no chão. (B) M2- Folhas secas presas no caule

**Fig. S2** (A) Gradiente de crescimento peciolar no genótipo M1. (B) Imagem ampliada do fenótipo de subsessilidade estabilizado em folhas expandidas 28 dias após as primeiras brotações do genótipo M1. (C) Imagem ampliada do fenótipo de concavidade observado na fase adaxial do pecíolo curto dos genótipos com subsessilidade.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>19</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANATÔMICA E FISIOLÓGICA DE GENÓTIPOS DE <i>Manihot esculenta</i> (Crantz) COM FENÓTIPO DE SUBSESSILIDADE FOLIAR</b> .....	<b>22</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>23</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>25</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 Locais das análises realizadas</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2 Genótipos de <i>M. esculenta</i></b> .....	<b>28</b>
<b>2.3 Análise do comprimento peciolar de genótipos de <i>M. esculenta</i></b> .....	<b>28</b>
<b>2.4 Genotipagem utilizando rep-PCR e IRAP-PCR</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5 Caracterização do gradiente de crescimento peciolar de genótipos de <i>M. esculenta</i></b> .....	<b>30</b>
<b>2.6 Análises de anatomia vegetal</b> .....	<b>30</b>
<b>2.7 Análises fisiológicas</b> .....	<b>31</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>

<b>3.1 Os genótipos M1 e M2 de <i>Manihot esculenta</i> apresentam um fenótipo de subsessilidade foliar .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Os genótipos M1 e M2 de <i>M. esculenta</i> possuem backgrounds genéticos distintos .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 A estabilização da subsessilidade nos genótipos M1 e M2 de <i>M. esculenta</i> é idade-dependente .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Folhas subsésseis estabilizadas nos genótipos M1 e M2 de <i>M. esculenta</i> apresentam uma consistente reorganização de tecidos e padrão estomatal pouco usual .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 A subsessilidade foliar está correlacionada com atributos fisiológicos potencialmente favoráveis em <i>M. esculenta</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>
<b>TABELAS .....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURAS .....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Manihot esculenta* (Crantz), conhecida popularmente como mandioca, aipim, ou macaxeira, é uma planta que produz raízes tuberosas pertencente à família Euphorbiaceae, considerada uma das principais culturas alimentares em regiões tropicais e subtropicais do mundo (DA COSTA NUNES et al., 2021; DE CARVALHO et al., 2022). Os elevados teores de carboidrato a tornam uma boa fonte de energia, servindo de base alimentar para mais de 800 milhões de pessoas em todo o globo terrestre (DE CARVALHO et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2022, GLEADOW et al, 2023).

O Brasil é o centro de origem e diversidade da mandioca. Estudos apontam o sudoeste da Bacia Amazônica como a localização da domesticação e dispersão da espécie a mais de 6000 mil anos (DA COSTA NUNES et al., 2021; AMELEWORK et al., 2022; GLEADOW et al, 2023). Em virtude da domesticação, a espécie, ao longo do tempo, se divergiu numa gama de diferentes genótipos, facilitada principalmente pela dispersão assexuada. Estima-se que haja pelo menos mais de 7000 variedades distribuídas pelo mundo (MÜHLEN et al., 2000; BARROS, 2011). Ao longo de sua dispersão, a mandioca se tornou altamente adaptada, conseguindo produzir mesmo em ambientes adversos, como em solos nutricionalmente pobres, ácidos e secos (EL-SHARKAWY et al., 1989; GLEADOW et al, 2023) bem típicas de algumas regiões do Brasil.

Atualmente o Brasil ocupa a quinta posição no ranking de maiores produtores de mandioca (DE CARVALHO et al., 2022). A região norte se destaca como a principal região produtora, com rendimento de aproximadamente 640 t/ha em 2018 (FAO, 2017). Em 2020, a safra brasileira alcançou 18,96 milhões de toneladas, com uma leve queda em 2021 devido aos preços baixos. A expectativa para 2022 é que a produção se mantenha em torno de 18 milhões de toneladas, distribuídas em 1,24 milhões de hectares (IBGE, 2018; IBGE, 2019; CONAB, 2022).

No estado do Espírito Santo, o cultivo da mandioca é predominantemente realizado por pequenos produtores e agricultores familiares. O município de Santa Leopoldina-ES se destaca na produção, sendo responsável por cerca de 40,16% da distribuição de raízes no estado, envolvendo 200 famílias agricultoras e gerando emprego e renda para a região (INCAPER, 2017).

A propagação da mandioca ocorre principalmente por meio da reprodução assexuada, através do plantio de manivas, das quais surgem os brotos e raízes, sendo a agricultura familiar uma das principais fontes para a produção dessa raiz (RÜSCHER et al., 2021). Essa prática de propagação permite que os pequenos agricultores fixem ao longo do tempo os genótipos de interesse, selecionando as plantas com melhor desempenho no campo, graças aos mecanismos evolutivos como mutações, migração, hibridação e introgressão (GLEADOW et al., 2023) que resultam na diversificação das populações (COSTA et al., 2013)

A presença de vários genótipos dentro de uma lavoura ocorre devido a uma prática comum entre os agricultores: a troca de manivas. Essa troca de manivas ocorre desde as comunidades tradicionais antigas e permanece até hoje. Embora inconsciente, tal prática é considerada como o principal meio de dispersão e diversidade da cultura de mandioca pelo mundo (EMPERAIRE; PERONI, 2007; COSTA et al., 2019).

Nas últimas décadas, devido às suas características agronômicas desejáveis, o cultivo da mandioca tem sido amplamente estudado para fins industriais (COOPER et al., 2007). Além de ser amplamente utilizada no setor alimentício humano (raíz) e animal (folhas) (ONI et al., 2010), a mandioca tem mostrado promissor potencial na indústria petrolífera. Estudos têm demonstrado avanços significativos no uso da mandioca para a produção de biocombustíveis e etanol (LU et al., 2011).

Para atender às demandas da indústria, é necessário realizar pesquisas e preservar toda essa diversidade. Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) desempenham um papel importante nesse contexto, permitindo a conservação e seleção de genótipos com características agronômicas e industriais de interesse. Essa estratégia não apenas preserva a diversidade genética, mas também contribui para a manutenção da agricultura moderna, que demanda variedades mais resistentes a fatores bióticos e abióticos, mantendo as características importantes que maximizam a produtividade e os valores nutricionais da cultura da mandioca (GOMES et al., 2007; ALBUQUERQUE, 2017).

Nesse contexto, vários avanços na área da genética e química vêm preenchendo as lacunas quanto ao melhoramento da mandioca nos últimos anos, como: detecção do gene que confere o amido ceroso em *M. esculenta*, (DO CARMO et al., 2020); qualidade da pasta do amido (DOS



SANTOS et al., 2022); detecção de genótipos com altos valores nutricionais, como: carotenóides (POSADA et al., 2006; CASTRICINI et al., 2014), ácido ascórbico (COUTO, 2013; CASTRICINI et al., 2014) e sacarose (CARVALHO et al., 2004).

No Brasil, boa parte das pesquisas relacionadas ao cultivo da mandioca é desenvolvida pela Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas – BA. Fora do Brasil, a Colômbia possui um dos mais importantes BAG do mundo, mantido pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), o qual vem desenvolvendo muitas pesquisas em torno de melhoramento e qualidade da mandioca, visando melhores teores de amido (HOWELLER, 2008; PÉREZ et al., 2008).

O CIAT, com apoio de várias instituições internacionais, visando obter diferentes teores de amido por meio da expressão de alelos recessivos nos acessos de elite do seu BAG, iniciou, desde 2004, pesquisas voltadas ao melhoramento por cruzamento entre parentais e autofecundações, obtendo vários acessos diferentes. Após anos promovendo a autopolinização, essas pesquisas provaram-se promissoras, obtendo-se um genótipo sem amilose em suas raízes (CEBALOS et al., 2007) e um outro acesso que apresentava um fenótipo com pecíolo curto (que pode ser descrito também como fenótipo de folhas subsésseis) e arquitetura ereta. Esta última é a principal descrição do fenótipo observado em acessos que apresentavam o pecíolo curto em *M. esculenta*.

Existem relatos de genótipos de mandioca que apresentam o fenótipo de folhas subsésseis entre os agricultores brasileiros. Alguns desses genótipos têm sido mantidos por comunidades tradicionais por anos sem estudos, e outros vêm sendo mantidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) (COUTO, 2013; CASTRICINI et al., 2014), sendo esses denominados popularmente pelos agricultores locais como Aipim Abacate, devido a intensa coloração verde escura das folhas e aspecto mais coriáceo. Embora algumas pesquisas incluam a descrição de alguns genótipos com pecíolo curto nas investigações como nos trabalhos de Couto (2013) e Castricini et al (2014), a menção à subsessilidade foliar ou a associação dos resultados obtidos com o fenótipo não aparece nos respectivos estudos. Esses achados evidenciam que, por muito tempo, pouca atenção tem sido direcionada a esse fenótipo, refletindo na escassez de informações sobre a sua significância

biológica e implicações para o desempenho agrônômico desses genótipos.

Para ampliar as informações acerca da subsessilidade foliar em *M. esculentae* compreender as potenciais implicações dessa variação sob alguns parâmetros fisiológicos, bioquímicos e anatômicos serão conduzidas análises comparativas entre genótipos contrastantes para o comprimento peciolar. Neste estudo, a abordagem polifásica, que inclui caracterização molecular, anatômica, bioquímica e fisiológica poderá fornecer uma descrição de base dos genótipos com folhas subsésseis.

A hipótese central deste estudo é que os genótipos com fenótipo de subsessilidade foliar possuem vantagens em condições de campo devido ao seu pecíolo reduzido, o que pode resultar em uma distribuição mais eficiente de fotoassimilados, graças a um menor percurso entre a fonte e o dreno. Essa suposição é baseada em dados semelhantes encontrados em soja com pecíolo curto (LIU et al., 2019; BAO et al., 2019), fornecendo indícios de que essa característica pode beneficiar a estrutura do dossel, aumentar a eficiência de sombreamento, aumentar a densidade de plantas por metro quadrado no campo e melhorar a produtividade devido a uma capacidade fotossintética aprimorada.

Essas informações são valiosas para futuros estudos na área de melhoramento genético de *M. esculenta*. Compreender as peculiaridades desses genótipos com subsessilidade foliar pode abrir novas possibilidades para o desenvolvimento/adaptação de variedades convencionais mais produtivas e resistentes com ferramentas de edição gênica. Esse estudo servirá de base para maximizar o rendimento das culturas e enfrentar os desafios ambientais que afetam a produção de *M. esculenta*.

## 2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar e descrever em níveis molecular, anatômico e fisiológico genótipos de mandioca (*Manihot esculenta*) que apresentam fenótipo de subsessilidade foliar.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar fenotipicamente genótipos de *M. esculenta* que possuem folhas subsesséis;
- Caracterizar em nível molecular genótipos de *M. esculenta* contrastantes quanto ao comprimento do pecíolo, utilizando rep-PCR e IRAP-PCR;
- Investigar particularidades anatômicas entre genótipos de *M. esculenta* contrastantes quanto ao comprimento do pecíolo;
- Mensurar parâmetros fisiológicos e bioquímicos em genótipos de *M. esculenta* contrastantes quanto ao comprimento do pecíolos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMELEWORK, A. B.; BAIRU, M. W. Advances in genetic analysis and breeding of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): A review. **Plants**, v. 11, n. 12, 2022.
- BAO, A.; CHEN, H.; CHEN, L.; CHEN, S.; HAO, Q.; GUO, W.; QIU, D.; SHAN, Z.; YANG, Z.; YUAN, S.; ZHANG, C.; ZHANG, X.; LIU, B.; KONG, F.; LI, X.; ZHOU, X.; TRAN, L.-SON P.; CAO, D. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmSPL9 genes alters plant architecture in soybean. **BMC plant biology**, v. 19, n. 1, p. 131, 2019.
- CARVALHO, L. J. C. B.; DE SOUZA, C. R. B.; DE MATTOS, C.; .J. C.; JUNIOR, C. B.; CAMPOS, L. Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. **Plant molecular biology**, v. 56, n. 4, p. 643–659, 2004.
- CASTRICINI, A; RODRIGUES, G V; JESUS, A M; SERPA, M. F. P. Caracterização de raízes de genótipos de mandioca produzidos no semiárido de Minas Gerais. **Revista Raízes e Amidos Tropicais Unesp**, v. 10, n. 1808– 981X, p. 23–37, 2014.
- CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; MORANTE, N.; FREGENE, M.; DUFOUR, D.; SMITH, A. M.; DENYER, K.; PÉREZ, J. C.; CALLE, F.; MESTRES, C. Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7469–7476, 2007.
- Conab - Histórico mensal mandioca**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca>>. Acesso em: 3 jul. 2023.
- COUTO, E. M. **Caracterização De Cultivares De Mandioca Do Semi-Árido Mineiro**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras- MG, Lavras, MG, 2013.
- COOPER, D.; DOUCET, L.; PRATT, M. Understanding in multinational organizations. **Journal of Organizational Behavior**, v. 28, n. 3, p. 303–325, 2007.
- DA COSTA, T. R.; FILHO, P. S. V.; GONCALVES-VIDIGAL, M. C.; GALVAN, M. Z.; LACANALLO, G. F. O; DA SILVA, L. I.; KVITSCHAL, M. V. Genetic diversity and population structure of sweet cassava using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. **African journal of biotechnology**, v. 12, n. 10, p. 1040–1048, 2013.
- DA COSTA NUNES, E.; UARROTA, V. G.; MORESCO, R.; MARASCHIN, M.; DA COSTA NUNES, E.; UARROTA, V. G.; MORESCO, R.; MARASCHIN, M. Physico-chemical profiling of edible or sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starches from Brazilian germplasm. **Food bioscience**, v. 43, n. 101305, p. 101305, 2021.
- DE CARVALHO, R. R. B.; MARMOLEJO CORTES, D. F.; BANDEIRA E SOUSA, M.; DE OLIVEIRA, L. A.; DE OLIVEIRA, E. J. Image-based phenotyping of cassava roots for diversity studies and carotenoids prediction. **PloS one**, v. 17, n. 1, p. e0263326, 2022.

CARVALHO, L. J. C. B.; DE SOUZA, C. R. B.; DE MATTOS CASCARDO, J. C.; JUNIOR, C. B.; CAMPOS, L. Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. **Plant molecular biology**, v. 56, n. 4, p. 643–659, 2004.

DO CARMO, C. D.; E SOUSA, M. B.; BRITO, A. C.; DE OLIVEIRA, E. J. Genome-wide association studies for waxy starch in cassava. **Euphytica; Netherlands journal of plant breeding**, v. 216, n. 5, 2020.

DOS SANTOS, C. S.; SOUSA, M. B.; BRITO, A. C.; DE OLIVEIRA, L. A.; CARVALHO, C. W. P.; DE OLIVEIRA, E. J. Genome-wide association study of cassava starch paste properties. **PloS one**, v. 17, n. 1, p. e0262888, 2022.

EMPERAIRE, L.; PERONI, N. Traditional management of agrobiodiversity in Brazil: A case study of manioc. **Human ecology: an interdisciplinary journal**, v. 35, n. 6, p. 761–768, 2007.

EL-SHARKAWY, M. A.; COCK, J. H.; PORTO, M. C. M. Características fotossintéticas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, v. 1, n. 2, p. 143-154, 1989.

FAO, 2018. **Food Outlook: Biannual report on global food markets– November 2018**. Disponível em: < <http://www.fao.org> >. Acesso em: 10. dez. 2018.

GLEADOW, R.; MAHER, K.; CLIFF, J. Cassava. **Current biology: CB**, v. 33, n. 10, p. R384–R386, 2023.

GOMES, C. N. Divergência genética entre clones de mandioca estimada por meio de caracteres agronômicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 12, 2007. Paravaí, **Anais**. Paravaí: Revista Raízes e Amidos Tropicais (CERAT - UNESP), 2007.

HOWELER, R. H. (ED.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 2008. Um novo futuro para a mandioca na Ásia. Seu uso é um alimento liberado e combustível para beneficiar os pobres. CIAT, **Programa Mandioca, Bangkok**, TH. 803 p

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da produção Agrícola-LSPA. Disponível em: < [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\[metnsal\]/Fasciculo/lspa\\_201701.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola[metnsal]/Fasciculo/lspa_201701.pdf) >.

INCAPER (INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL). **Santa Leopoldina é destaque na comercialização de mandioca**, 2016. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/Not%C3%ADcia/santa-leopoldina-e-destaque-na-comercializacao-de-mandioca>. Acesso em 27 de julho 2022.

LIU, M.; WANG, Y.; GAI, J.; BHAT, J. LI, Y.; KONG, J.; ZHAO, T. Genetic analysis and gene mapping for a short-petiole mutant in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Agronomy (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 11, p. 709, 2019.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de

mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 319–328, 2000.

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs e inference on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 517–526, 2004.

ONI, A. O.; ARIGBEDE, O. M.; ONI, O.; ONWUKA, C. F. I.; ANELE, U. Y.; ODUGUWA, B. O.; YUSUF, K. O. Effects of feeding different levels of dried cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) based concentrates with *Panicum maximum* basal on the performance of growing West African Dwarf goats. **Livestock science**, v. 129, n. 1–3, p. 24–30, 2010.

PÉREZ, C. J.; CALLE, F.; MORANTE, N.; CEBALLOS, H.; MAFLA, G.; DEBOUCK, D.; BECERRA, A. L. **Initial description of a mutation affecting plant architecture in cassava**. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/132668511.pdf>>. Acesso em: 3 jul. 2023.

RÜSCHER, D.; CORRAL, J. M.; CARLUCCIO, A. V.; KLEMENS, P. A. W.; GISEL, A.; STAVOLONE, L.; NEUHAUS, H. E.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U.; ZIERER, W. Auxin signaling and vascular cambium formation enable storage metabolism in cassava tuberous roots. **Journal of experimental botany**, v. 72, n. 10, p. 3688–3703, 2021.

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Physiology and Molecular Biology of Plants* (PMBP).

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANATÔMICA E FISIOLÓGICA DE GENÓTIPOS DE *Manihot esculenta* (Crantz) COM SUBSESSILIDADE FOLIAR**

Serli de O. Cabral<sup>1</sup>; Wilian R. Ribeiro<sup>1</sup>; Dalila da C. Gonçalves<sup>1</sup>; Laiane S. Maciel<sup>1</sup>; Thamyres da S. Cardoso<sup>1</sup>; Márcia F. Ferreira<sup>1</sup>; Elisandra da S. Souza<sup>2</sup>; Willian B. Moraes<sup>1</sup>, Dimmy Herllen S. G. Barbosa<sup>3</sup>; Éder de S. Martins<sup>3</sup>; Wagner C. Otoni<sup>2</sup>, André da S. Xavier<sup>1†</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Agronomia, Alegre, ES, 29500-000.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Viçosa, MG, 36570-900.

<sup>3</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, 44380-000.

†Autor correspondente: André da Silva Xavier

Fone: (+55-31) 99100-0429; E-mail: andre.s.xavier@ufes.br

## RESUMO

Dentre as culturas de subsistência mais importantes no mundo, a mandioca é uma das mais distribuídas fontes de alimento, sendo amplamente cultivada em diversos países e muito utilizada pela indústria alimentícia humana e animal. O objetivo da presente pesquisa foi caracterizar, descrever e comparar em níveis molecular, anatômico e fisiológico dois genótipos de mandioca (*Manihot esculenta*) que apresentam o fenótipo de subsessilidade foliar, contrastante com os padrões de variedades convencionais. As análises moleculares utilizando as técnicas rep-PCR e IRAP-PCR forneceram informações valiosas e revelaram que os genótipos variantes com folhas subsesséis são geneticamente distintos, apesar de compartilharem o fenótipo de subsessilidade, o que sugere que essa variação pode estar difundida em diferentes *backgrounds* genéticos da espécie. As análises anatômicas das folhas e dos pecíolos revelaram alterações significativas nos genótipos de pecíolo curto (M1 e M2) em comparação com o genótipo de pecíolo longo (C4). Essas alterações incluíram a presença abundante de papilas e um parênquima lacunoso mais espesso, além de um mesófilo hiposestomático com estômatos presentes apenas na parte adaxial. Nos pecíolos curtos estabilizados, os feixes vasculares foram isolados em uma estrutura *shell-like*, semelhante a uma concha, e circundados por células do parênquima de preenchimento/fundamental, e o câmbio não foi identificado. Esses resultados em conjunto sugerem que a variação encontrada nos genótipos com subsessilidade foliar pode estar associada a uma resposta diferencial a fatores edafoclimáticos, mas ainda são necessários ensaios complementares para uma concreta explanação. A análise fisiológica demonstrou que os genótipos com pecíolo curto apresentaram uma resposta semelhante a plantas sujeitas a sombreamento parcial, com um aumento nos níveis totais de clorofila, especialmente na clorofila *b*, e um equilíbrio de índice de nitrogênio mais elevado em comparação com os genótipos convencionais. Isso indica uma possível proteção dos mesmos à condições de maior exposição à luz, causada pelo sombreamento natural resultante do menor tamanho dos pecíolos e da arquitetura de dossel resultante, tipo 'bouquet'. Pesquisas adicionais em nível do transcriptoma e proteoma desses genótipos variantes, serão fundamentais para o mapeamento do(s) fator(e)s genético(s) que controlam esse fenótipo em *M. esculenta*, no intuito de expandir as potencialidades dessa cultura através da modulação do desenvolvimento peciolar mediante Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs).



**PALAVRAS-CHAVE:** Mandioca. Variabilidade. Comprimento Peculiar. Arquitetura do dossel. Agricultura.

**ABSTRACT**

Among the most important subsistence crops in the world, cassava is one of the most distributed food sources, being widely cultivated in several countries and widely used by the human and animal food industry. The objective of this research was to characterize, describe and compare at molecular, anatomical and physiological level two cassava (*Manihot esculenta*) genotypes that present a leaf subsessility phenotype, contrasting with the patterns of conventional varieties. Molecular analyzes using the rep-PCR and IRAP-PCR techniques provided valuable information and revealed that variant genotypes with subsessile leaves are genetically distinct, despite sharing the subsessile phenotype, which suggests that this variation may be widespread in different genetic backgrounds of the species. Anatomical analysis of leaves and petioles revealed significant changes in the short-petiole genotypes (M1 and M2) compared to the long-petiole genotype (C4). These alterations included the abundant presence of papillae and a thicker spongy parenchyma, in addition to a hypostomatic mesophyll with stomata present only in the adaxial part. In the short petioles stabilized, the vascular bundles were isolated in a shell-like structure, similar to a shell, and surrounded by medullary cells, and the vascular cambium was not identified. These results together suggest that the variation found in genotypes with leaf subsessility may be associated with a differential response to edaphoclimatic factors, but further tests are still needed for a concrete explanation. Physiological analysis demonstrated that short petiole genotypes showed a similar response to plants subjected to partial shading, with an increase in total chlorophyll levels, especially chlorophyll *b*, and a higher nitrogen index balance compared to conventional genotypes. This indicates a possible protection of them from conditions of greater exposure to light, caused by natural shading resulting from the smaller size of the petioles and the resulting canopy architecture, type 'bouquet'. Additional research on the transcriptome and proteome of these variant genotypes will be fundamental for mapping the genetic factors that control this phenotype in *M. esculenta*, with the aim of expanding the potential of this culture through modulation of the petiole development through Innovative Techniques of Improvement of Precision (TIMPs).

**KEYWORDS:** Cassava. Variability. Petiolar Length. Canopy architecture. Agriculture.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas de uma maneira geral, possuem estruturas similares como folhas e pecíolos, porém essas estruturas divergem dentro de cada espécie. O espaço entre as folhas e o caule é denominado como pecíolo. O comprimento peciolar influencia na arquitetura do dossel da planta, além do ângulo do pecíolo da folha e na capacidade de ramificação. Como reflexo, a produtividade de algumas culturas depende da arquitetura do dossel, considerada uma importante característica agrônômica, que sustenta o aumento da fotossíntese por intermédio de uma eficiente captação de luz (ISODA; MORI, 2015; MWANAMWENGE; SIDDIQUE, 1997; THOMAS; RAPER, 1985; NIINEMETS; FLECK, 2002). O pecíolo participa como uma estrutura chave para o transporte e distribuição de águas e solutos e de fotoassimilados, promovendo o desenvolvimento da planta (HUA-WEI, 2022).

Em muitas plantas, o comprimento do pecíolo tende a ser elevado para permitir uma melhor arquitetura do dossel e evitar sombreamento pelas folhas vizinhas, o que facilita a fotossíntese (LI et al., 2021). No entanto, em certas espécies como *Glycine max*, a descoberta dos genes *LPS1* e *LPS3*, juntamente com suas mutações confere um fenótipo de pecíolo curto que resultaram em características agrônômicas desejáveis em campo (KILEN, 1983; JUN et al., 2009; JUN et al., 2012; LIU et al., 2019; BAO et al., 2019; HUA-WEI, 2022).

Estudos com *Arabidopsis thaliana* revelaram que o fenótipo de pecíolo curto é influenciado por fatores de transcrição do tipo *At-Hook Motif Nuclear Localized Protein* (AHL27), os quais competem com fatores de transcrição *Phytochrome Interacting Factors* (PIF's) pelo mesmo sítio ativo de ligação (FAVERO et al., 2020).

Existem relatos de genótipos de mandioca que apresentam o fenótipo de folhas subsésseis entre os agricultores brasileiros. Alguns desses genótipos têm sido mantidos por comunidades tradicionais por anos sem estudos, e outros vêm sendo mantidos por instituições de pesquisa nacionais (COUTO, 2013; CASTRICINI et al., 2014), sendo esses denominados popularmente por alguns agricultores locais como ‘Aipim abacate’, devido a intensa coloração verde escura das folhas e aspecto mais coriáceo. Embora algumas pesquisas incluam a descrição de alguns genótipos com pecíolo curto nas investigações, a menção à subsessilidade foliar ou a associação dos resultados obtidos com o fenótipo não aparece nos respectivos estudos. Esses achados evidenciam que, por muito tempo, pouca

atenção tem sido direcionada à esse fenótipo, refletindo na escassez de informações sobre a sua significância biológica e implicações para o desempenho agrônômico desses genótipos.

*Manihot esculenta* Crantz é a principal espécie do gênero usada para fins alimentares (HOUG et al., 2020; DA COSTA NUNES et al., 2021; DE CARVALHO et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2022). Apesar de ser conhecida por sua rusticidade e capacidade de adaptação em solos pobres e ácidos (EL-SHARKAWY et al., 1989; GLEADOW et al., 2023), a domesticação da mandioca teve um papel significativo em moldar sua diversidade e distribuição global (DA COSTA NUNES et al., 2021; AMELEWORK et al., 2022).

Contudo, fatores bióticos e abióticos continuam representando ameaças para os cultivos de mandioca em todo o mundo. Nesse sentido, há uma busca crescente por novos genótipos com ampla adaptação para enfrentar as mudanças climáticas. Essa abordagem é essencial para garantir a segurança alimentar de mais de 700 milhões de pessoas que dependem da mandioca como principal fonte de alimento em seu dia a dia (HOUG et al., 2020; DE CARVALHO et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2022).

Neste estudo são caracterizados dois genótipos atípicos dentro da espécie *M. esculenta* que apresentam subsessilidade foliar. Através de uma abordagem polifásica comparativa entre genótipos contrastantes para o comprimento peciolar, parâmetros fisiológicos, anatômicos e moleculares foram investigados. Aqui, a hipótese central é que os genótipos com subsessilidade foliar apresentam uma resposta superior em campo devido ao comprimento divergente do pecíolo, o que potencialmente resulta em uma distribuição mais eficiente de fotoassimilados e nutrientes.

Avanços nesse campo possibilitarão descobertas e perspectivas promissoras para a identificação de genes candidatos envolvida com o controle genético do desenvolvimento peciolar para fomentar futuros programas de melhoramento de mandioca e outras culturas. À medida que avançamos em nosso entendimento sobre a subsessilidade foliar e suas vantagens potenciais, subsequentes etapas abrirão caminho para uma agricultura com garantias de segurança alimentar.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Local dos experimentos e análises

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizado no município de Alegre-ES e na Área experimental da Ufes, localizada em Rive-ES. As análises referentes à anatomia peciolar e foliar foram realizadas no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

### 2.2 Genótipos de *M. esculenta*

O genótipo de *M. esculenta* de pecíolo curto (fenótipo de subsessilidade foliar), gentilmente cedido por agricultores familiares de Santa Teresa-ES, foi nomeado no presente trabalho como Makcugý (M1), uma expressão que significa perna curta, do vocabulário dos povos originários da etnia Krenak (Botocudos), que foram vítimas de constantes massacres decretados como “guerras justas” pelo governo colonial e habitaram as terras Espírito Santo desde os primórdios. O BAG/Embrapa Mandioca e Fruticultura forneceu o genótipo de pecíolo curto Aipim Abacate (M2) e os genótipos de pecíolo longo BGM0541 (C1), BGM0040 (C2), BGM0687 (C3). O genótipo Cacau Branca (C4), que é uma variedade convencional, foi adquirido em Alegre, ES (Tabela 1).

### 2.3 Análise do comprimento peciolar de genótipos de *M. esculenta*

Os genótipos de *M. esculenta* M1, M2, C1, C2, C3 e C4 foram cultivados em solo devidamente uniforme comparação, gradagem e sistema de irrigação (Tabela 1). As manivas-semente foram coletadas de plantas adultas com aproximadamente 9 a 12 meses e cortadas com tamanho de 15 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. Ascovas para o plantio foram abertas com espaçamento de 1,0m entre parcelas; 0,8 m entre plantas; e 0,9 m entre linhas dentro das parcelas. O desenho experimental utilizado foi delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições distribuídas em dois blocos. Seis meses após o plantio o comprimento dos pecíolos de folhas expandidas foi medido com o auxílio de paquímetro. Foram realizadas três repetições biológicas e cinco repetições técnicas. A análise de variância (ANOVA) foi realizada usando o pacote Agricolé no software R. As

análises de agrupamento de Scott-Knott foram realizadas considerando nível de significância de 0,05.

#### **2.4 Genotipagem utilizando rep-PCR e IRAP-PCR**

Os marcadores moleculares rep-PCR e IRAP-PCR foram utilizados para a caracterização molecular dos genótipos M1, M2, C1, C2, C3 e C4 (Tabela 1). O DNA genômico foi isolado de aproximadamente 500 mg de tecido vegetal (cinco plantas por genótipos). A extração do DNA genômico foi conduzida conforme descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações. As amostras foram quantificadas usando espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific®) e mantidas em freezer a -20 °C. Os oligonucleotídeos usados no experimento estão descritos na Tabela 2.

As reações de PCR foram realizadas com 45ng de DNA genômico, 5x HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne®, Tartu, Estônia) e 10 pmol/μL de cada oligonucleotídeo em um volume final de 20μL. As condições de amplificação foram as seguintes para cada marcador: (i) REP: 95°C por 15 minutos, seguidos por 41 ciclos de 95°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 7 minutos; (ii) BOX 95°C por 15 minutos, seguidos por 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 40°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 5 minutos; (iii) ERIC: 95°C por 15 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 2 minutos, 48°C por 1 minuto e 72°C por 8 minutos, e extensão final de 72°C por 15 minutos; (iv) IRAP: 95°C por 15 minutos, seguidos por 36 ciclos de 95°C por 30 segundos, gradiente de 45°C a 58°C por 1 minuto e extensão de 72°C por dois minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. As aplicações foram realizadas no termociclador Locus/TC-9639 (Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1%, utilizando uma voltagem constante de 80 V por 4 horas. Os géis foram visualizados por coloração com GelRed e a imagem foi capturada usando um fotodocumentador L-pix EX (Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

A análise de dissimilaridade entre os genótipos foi baseada em análise binária, presença ou ausência de bandas a partir do resultado das amplificações por PCR. Um código binário, onde 0 representa a ausência de banda e 1 representa a presença de banda foi utilizado para o processamento dos dados. O perfil das bandas foi analisado com o software NTSYS, versão 2.1 (ROHLF, 2000). Com base no coeficiente de similaridade, os genótipos

foram agrupados para gerar uma matriz de distância genética Jaccard (1909), e para construir um dendrograma UPGMA.

Para confirmar a origem dos amplicons obtidos pelas técnicas rep-PCR e IRAP-PCR, os produtos de PCR foram clonados usando o vetor pGEM<sup>®</sup> (Promega Corporation) seguido pela transformação em células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . O DNA plasmidial foi purificado usando o Kit de purificação de DNA plasmidial (Ludwig<sup>®</sup>) e foi sequenciado pelo método de Sanger na empresa ACTGene Análises Moleculares, localizada no Rio Grande do Sul, Brasil.

## 2.5 Caracterização do gradiente de crescimento peciolar de genótipos de *M. esculenta*

Os genótipos de *M. esculenta* M1, M2 e C4 foram selecionados para a análise do gradiente de crescimento do pecíolo de folhas expandidas ao longo dos fitômeros de cada planta. O plantio foi conduzido em solo seguindo o desenho experimental DIC, conforme descrito no item “2.3 Análise do comprimento peciolar de genótipos de *M. esculenta*”. Dois meses após o plantio o comprimento dos pecíolos de folhas já expandidas foram medidos com o auxílio de paquímetro. Foram realizadas três repetições biológicas para cada um dos pecíolos ao longo de nove nós avaliados por planta.

## 2.6 Análises de anatomia vegetal

Para a caracterização anatômica, foram utilizados os genótipos de *M. esculenta* M1 e M2 que possuem o fenótipo de pecíolo curto, e o genótipo C4 que representa o grupo dos genótipos que apresentam o fenótipo de pecíolo longo. As amostras de folhas e pecíolos foram coletadas seguindo a seguinte estratégia: para o genótipo C4, foram coletadas as partes medianas dos pecíolos longos (PL), que são o único padrão de comprimento para esse genótipo; para os genótipos M1 e M2, onde nota-se variabilidade no comprimento do pecíolo ao longo do crescimento da planta, foram coletadas as partes medianas dos: (i) pecíolos longos, que apresentam fenótipo típico, na porção basal (PL), (ii) pecíolos intermediários, que apresentam uma redução no comprimento comparada aos pecíolos basais, terço médio da planta (PI) e (iii) pecíolos curtos, que correspondem ao perfil fenotípico pouco usual para essa espécie, na porção apical (PC). Secções transversais da região mediana de folhas e pecíolos coletados foram fixadas em solução de FAA 50%. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica de concentração crescente e incluídas em historesina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Posteriormente, secções transversais de 5  $\mu$ m de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço

automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA), e coradas com azul de toluidina (pH 4,6) por 5 minutos (O'Brien & McCully, 1981). As lâminas foram montadas em Permount® SP15-500 (Fisher Scientific) e as imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica digital (AxionCam HRc, Zeiss) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

## 2.7 Análises fisiológicas

Para as análises fisiológicas foram utilizados os genótipos de *M. esculenta* M1 e M2 que apresentam o fenótipo de pecíolo curto, e o genótipo C4 que representa o grupo dos genótipos com pecíolo longo. As medições foram realizadas em plantas com quatro meses de idade plantadas e cultivadas conforme descrito no item “2.3 Análise do comprimento peciolar de genótipos de *M. esculenta*”. As medições foram realizadas no terço médio central das plantas, localizada a aproximadamente um metro da base em direção ao ápice. Cada planta foi submetida a uma média de três medições em cinco folhas, resultando em um total de 15 medições por planta (três lóbulos por folha).

As medições foram realizadas utilizando o clorofilômetro DUALEX (Dualix FORCE-A, Orsay, França), para determinação dos índices de clorofila total (ChT), flavonoides (Flv), antocianinas e o índice de balanço de nitrogênio (NBI). Para avaliar a distinção entre clorofila *A* (ChA) e clorofila *B* (ChB), foram utilizados o aparelho ClorofiLOG - CFL 1030 (FALKER). Além disso, imagens térmicas foram realizadas utilizando o dispositivo Flir One Pro Lt (modelo USB-C, resolução de 4800) (Flir Technologies).

As análises estatísticas foram realizadas no software SISVAR (Ferreira, 2011). Os dados coletados foram submetidos a uma análise descritiva, seguida por uma análise de variância (ANOVA) para comparar as médias das variáveis entre os grupos. Utilizou-se o teste de Tukey como método de comparação múltipla, permitindo identificar diferenças significativas entre os genótipos. Adotou-se um nível de significância de 0,05. Para interpretação dos dados de temperatura foliar foi realizado o teste de agrupamento de Scott-Knott considerando nível de significância de 0,05.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Os genótipos M1 e M2 de *Manihot esculenta* apresentam um fenótipo de subsessilidade foliar

O grupo representante dos genótipos que apresentam o fenótipo de pecíolo curto em folhas expandidas (M1 e M2) é visualmente distinguível do grupo de genótipos que apresentam o pecíolo longo (C4 e C2) (Fig. 1A). Além disso, os genótipos com subsessilidade foliar (M1 e M2) apresentam características adicionais, tais como, pecíolo mais robusto, flexível e com maior diâmetro quando comparado com genótipos de pecíolo longo (Fig. 1B).

Para validar o contraste entre os grupos analisados as médias de crescimento peciolar dos genótipos foram comparadas. Os resultados mostram que o comprimento do pecíolo de genótipos que apresentam subsessilidade foliar pode ser em média até 17 vezes menor do que os genótipos de pecíolo longo (Fig 1C;  $p < 0,05$ ). Interessantemente, como informação adicional sobre os genótipos que apresentam subsessilidade foliar, observa-se que as folhas apresentam senescência e abscisão foliar tardias, pois levam mais tempo para secar e, quando secas, permanecem na planta até se deteriorarem completamente, sem se desprenderem do caule ocasionando assim uma perfeita cicatrização (Fig. S1).

#### 3.2 Os genótipos M1 e M2 de *M. esculenta* possuem *backgrounds* genéticos distintos

Para investigar as relações genéticas entre os genótipos de pecíolo curto (M1 e M2) e pecíolo longo (C3, C4, C5 e C6) foram utilizados os marcadores moleculares rep-PCR e IRAP-PCR. As PCRs foram realizadas com os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2.

A técnica rep-PCR é amplamente utilizada em estudos de variabilidade genética de bactérias, fungos e, mais recentemente, vem sendo utilizada em plantas (ASHUTOSH et al., 2005; VISWANATHASWAMY; NIZAMPATNAM, 2013). Estudos prévios mostram a aplicação da rep-PCR para análises de variabilidade genética em representantes da família Euphorbiaceae (RAMPADARATHA et al., 2015). Para *M. esculenta* Crantz as análises com rep-PCR mostraram resultados discriminantes e informativos, sendo o primeiro relato de uso da técnica para esta espécie. O número total de bandas polimórficas observadas foram 10 para o marcador ERIC, seguida por cinco para o marcador BOX e três para o marcador REP.

Os fragmentos amplificados apresentaram tamanhos entre 100 e 1500 pares de bases (pb) (Fig.2A, Tabela 3).

Um total de 15 fragmentos amplificados foram sequenciados após a clonagem e o resultado obtido, conforme esperado, revelou que todos os clones se tratam de sequências de DNA extracromossomal derivadas do genoma mitocondrial de *M. esculenta*. Através da análise utilizando a ferramenta BLASTn do NCBI houve *hits* de todas as sequências clonadas, para a técnica rep-PCR, com o acesso NC\_045136.1\_Manihot esculenta mitochondrion, complete genome.

Para as análises com os marcadores IRAP, foram testados 12 oligonucleotídeos, dos quais, cinco foram polimórficos (AYF5, AFY9, AFY12, AFY4 e AFY8), dois monomórficos (AYF 2 e AYF 6) e três falharam na amplificação (AYF 7, AFY 10 e AFY 11). Dentre os marcadores polimórficos, o tamanho dos fragmentos amplificados variou de 250 a 3000 pb. AFY3 apresentou o maior número total de bandas polimórficas (14), seguido por AFY5 (5), AFY9 (4), AFY12 (2), AFY4 e AFY8 (1) (Fig.3A, Tabela 3).

Os dendrogramas UPGMA foram utilizados para acessar o agrupamento da distância genética e do índice de dissimilaridade de Jaccard. Os resultados revelaram que os genótipos de pecíolo curto (M1 e M2) não formam um clado separado dos genótipos de pecíolo longo (C1, C2, C3 e C4), indicando que não há *background* genético padrão que sustente o fenótipo de subsessilidade foliar, o que não descarta a existência de um locus ou vários *loci* comuns controlando o desenvolvimento peciolar em *M. esculenta* (Fig. 2B e 3B). A variação quanto ao posicionamento dos genótipos M1 e M2 em distintos grupos nos dendrogramas obtidos para rep-PCR e IRAP-PCR, pode ser reflexo da cobertura diferencial do repertório genético por esses marcadores, sendo o primeiro mitocondrial e o segundo nuclear (Fig. 2B e 3B).

Juntos esses resultados sugerem que pela subsessilidade peciolar pode ocorrer em qualquer genótipo, resultando em uma ampla variedade de características distintas. Estudos complementares estão sendo conduzidos para o sequenciamento dos fragmentos polimórficos entre os genótipos de pecíolo curto e pecíolo longo, porém compartilhados entre M1 e M2.

### 3.3 A estabilização da subsessilidade nos genótipos M1 e M2 de *M. esculenta* é idade-dependente

Para avaliar o perfil de subsessilidade foliar bem como a sua estabilização nos genótipos M1 e M2 foram realizadas medições do comprimento dos pecíolos em folhas expandidas desde o primeiro fitômero da planta (n1) até a completa estabilização do fenótipo de pecíolo curto. A completa estabilização do comprimento dos pecíolos curtos foi observada no nono (n9) nó da planta, 28 dias após a brotação das manivas. O genótipo C4 foi utilizado para representar o fenótipo de pecíolo longo do grupo que apresenta essas mesmas características, típicas em variedades convencionais (Fig. 4).

Durante o primeiro mês de desenvolvimento, os genótipos M1 e M2 possuem folhas com nítida instabilidade no comprimento dos pecíolos, que podem ser divididos em três momentos: (i) pecíolo longo, terço basal da planta (PL), cilíndrico e fino, fenótipo típico para a espécie; (ii) pecíolo intermediário (PI), marcado pelo espessamento do pecíolo em comparação ao PL, tornando-se mais robusto e exibindo uma concavidade no centro, além da redução no comprimento comparado ao anterior; e (iii) pecíolo curto (PC), estágio onde ocorre estabilização da subsessilidade foliar com o pecíolo apresentando em média 2 cm, no qual o mesmo torna-se mais espesso do que o PL e PI, com uma concavidade mais acentuada no centro (Fig. 1B; Fig. S2 e Fig. 5A).

Quando comparamos o comportamento dos genótipos podemos observar que o perfil do gradiente de crescimento peciolar do M1 é mais estável e gradativo, enquanto M2 é mais instável e apresenta uma amplitude maior de crescimento entre os nós da planta antes da estabilização fenotípica. No entanto, ambos apresentam estabilidade do fenótipo na inserção peciolar entre o oitavo (n8) e nono (n9) nó da planta. A partir da estabilização do fenótipo, os genótipos M1 e M2 apresentam o comprimento médio peciolar de 1,02 e 1,06 cm, respectivamente. C4 apresenta crescimento peciolar constante ao longo dos nós da planta e tem um comprimento médio de 13,17 cm (Fig. 4A).

O processo de subsessilidade foliar resulta na formação de uma arquitetura de planta ereta com um dossel folhoso denso tipo ‘bouquet’, em que as folhas se encontram em proximidade umas das outras, promovendo sobreposição maior do que o observado para os genótipos de pecíolo longo (Fig. 4B-E;  $p < 0,05$ ).

### **3.4 Folhas subsésseis estabilizadas nos genótipos M1 e M2 de *M. esculenta* apresentam uma consistente reorganização de tecidos e padrão estomatal pouco usual**

Em termos anatômicos, os principais caracteres contrastantes observados entre o genótipo convencional (C4) e os variantes (M1 e M2) são mais evidentes nos pecíolos PI e PC e na anatomia foliar (Fig. 5 e Fig. 6). Quanto aos pecíolos, todas as imagens foram ampliadas em 4x para facilitar a visualização dos feixes vasculares, câmbio e epiderme nos três estágios do gradiente de sessilidade ao longo do desenvolvimento dos genótipos M1 e M2 (Fig. 5A). Nos pecíolos PL e PI (Fig. 5B-D), é possível identificar a presença de feixes vasculares (Fv) com vasos xilemáticos (X) e floemáticos (Fl) claramente visíveis em todos os genótipos. Além disso, a presença do câmbio (C) ao redor dos feixes vasculares é bastante evidente. Na região subepidérmica, encontra-se o parênquima cortical (Pc), composto por camadas celulares visíveis. No entanto, no pecíolo curto (PC) (Fig. 5B-C), as camadas, outrora bem definidas do parênquima cortical (em PL e PI), estão ausentes e o câmbio não é mais distinguível. Os feixes vasculares assumem uma forma *shell-like* (semelhante a uma concha) sendo circundados por células do parênquima medular.

Em todos os genótipos, o mesófilo é dorsiventral heterogêneo (Fig. 6), composto por parênquima paliçádico (Pp) e parênquima lacunoso (Pl). Nos genótipos M1 e M2, os estômatos ocorrem exclusivamente entre as células da fase abaxial, resultando em uma condição hipoestomática (Fig. 6 B-C). Por outro lado, no genótipo C4, foi observado que os estômatos diferenciados em ambas as faces da folha, caracterizando-o como anfiestomático (Fig. 6D). Além disso, nos genótipos M1 e M2 a camada de parênquima lacunoso é significativamente mais espessa e desorganizada, juntamente com uma alta densidade de papilas na face adaxial da lâmina foliar quando comparadas ao genótipo C4. As células do parênquima paliçádico têm uma aparência cilíndrica e alongada nas variantes, mas são mais espessas na convencional C4 (Fig. 6B-D).

### **3.5 A subsessilidade foliar está correlacionada com atributos fisiológicos potencialmente favoráveis em *M. esculenta***

Os genótipos M1 e M2 apresentam folhas com intensa coloração verde escura e aspecto mais coriáceo do que o genótipo C4 e outros genótipos (C) do grupo que apresenta folhas com pecíolo longo (dados não mostrados). Além disso, a arquitetura do dossel compacta tipo 'bouquet' proporciona um maior adensamento de folhas e índice de

sombreamento para os genótipos com subsessilidade foliar (Fig. 6A-B). Visto que essas são características agrônômicas importantes, nós decidimos investigar o índice de clorofila, índice de flavonóides, índice do balanço de nitrogênio e temperatura foliar entre os representantes de genótipos que apresentam pecíolo curto e pecíolo longo.

Com a determinação dos índices foi possível observar diferenças significativas entre os genótipos de pecíolo curto e pecíolo longo para os seguintes parâmetros: conteúdo de clorofila total e clorofila *B*, relação de clorofila *A* e clorofila *B* e o balanço de nitrogênio. Não foram detectadas diferenças significativas para o conteúdo de clorofila *A* e flavonoides (Fig. 6C-H;  $p < 0,05$ ). A temperatura foliar dos genótipos M1 e M2 tem média de 3 °C mais baixo que o genótipo C4 (Fig. 7A-D;  $p < 0,05$ ). Juntos esses resultados sugerem que a subsessilidade foliar está correlacionada positivamente com a síntese de clorofila *B* e o balanço de nitrogênio na planta, e negativamente com a temperatura foliar.

#### 4. DISCUSSÃO

Mutações associadas ao fenótipo de subsessilidade foliar em *Manihot esculenta* podem ocorrer espontaneamente ou ser induzidas, como descrito por Howeler (2008), que atribuíram o fenótipo pouco usual de pecíolos curtos em genótipos de *M. esculenta* à ocorrência de alelos recessivos ainda não caracterizados, através de uma inferência via clássica baseada em autofecundações e retrocruzamentos. A descrição dos genótipos Makcugý (descrita nessa pesquisa) e Aipim Abacate (BAG-Embrapa Mandioca e Fruticultura), que naturalmente apresentam folhas subsésseis, é relativamente recente, mas tem inspirado novas hipóteses para aprofundamento sobre as implicações desse fenótipo em atributos agrônômicos. Ambos genótipos exibem um padrão de crescimento com arquitetura do dossel adensado, descrito aqui como tipo ‘bouquet’ devido o encurtamento dos pecíolos que resulta em um sombreamento parcial de toda a planta.

Na espécie *M. esculenta* e em outras espécies do mesmo gênero, é comum e frequentemente observada a presença de pecíolos com configuração morfológica ainda que irregular de formato cilíndrico com os feixes vasculares organizados (GRACIANO-RIBEIRO et al., 2009; GRACIANO-RIBEIRO et al., 2016; SILVA, 2016; DA SILVEIRA, et al., 2019) e ocasionalmente achatado-dorsiventralmente, relatado em *M. reniformis* (SILVA, 2016). No entanto, nos genótipos com subsessilidade foliar, M1 e M2, além de exibirem um gradiente de crescimento diferenciado de pecíolos durante a fase inicial de crescimento, observa-se um desvio desproporcional no diâmetro dos pecíolos PI e PC, resultando na formação de uma concavidade fixa na região superior dos pecíolos curtos estabilizados.

Embora os genótipos com folhas subsésseis compartilhem semelhanças em seus padrões fenotípicos, a análise com os marcadores moleculares, derivados de técnicas distintas, revelou um cenário estocástico para a ocorrência da(s) putativa(s) ‘assinatura(s) moleculare(s)’ associada(s) a subsessilidade foliar em *M. esculenta*, pois não há um padrão identificável de *background* genético, que esteja associado ao fenótipo, sugerindo fortemente que o padrão pode ocorrer espontaneamente em qualquer genótipo/variedade.

O estudo dos fatores genéticos e das vias de sinalização que influenciam o desenvolvimento do pecíolo em plantas é uma área de pesquisa recente e tem proporcionado oportunidades para investigar um conjunto de genes envolvidos. Esse tema tem sido explorado em diferentes eudicotiledôneas, como soja (JUN et al., 2009; JUN et al., 2012; LIU et al., 2019; HUA-WEI, 2022) e *Arabidopsis thaliana* (TSUKAYA et al., 2002; FAVERO et

al., 2020). Em *M. esculenta*, não existem informações detalhadas sobre o controle genético dessa característica, o que tem estimulado uma das nossas hipóteses para validações futuras, baseada em um estudo conduzido por Favero et al. (2020), que sugere que em *A. thaliana*, os fatores de transcrição *Phytochrome Interacting Factors* (PIFs) e *At-Hook Motif Nuclear Localized Protein* (AHL) estão envolvidos em uma dinâmica de ativação/repressão do desenvolvimento peciolar ao competirem pelo mesmo sítio de ligação ativo em regiões regulatórias-chave. Em plantas *knockout* para o gene *AHL27*, observou-se o desenvolvimento de pecíolos longos, enquanto a superexpressão do gene *AHL27* resultou em um fenótipo de pecíolos curtos. Esses resultados ampliam as perspectivas acerca de uma possível participação desses fatores de transcrição na determinação da subsessilidade também em outras espécies, incluindo *M. esculenta*. Já iniciamos esforços para avaliar o perfil de expressão desses genes homólogos nos genótipos contrastantes para a característica do comprimento do pecíolo e também durante a estabilização do pecíolo curto ao longo do gradiente de sessilidade em M1 e M2.

A utilização de marcadores baseados em retrotransposons demonstrou alta eficácia na distinção dos seis genótipos analisados, mesmo com um número reduzido de indivíduos. De acordo com os resultados obtidos por Khun et al. (2016), o marcador AFY 2 (11) foi o mais polimórfico para *M. esculenta*, enquanto os primers AYF 3, AYF 6, AYF 7, AYF 10 e AYF 11 não amplificaram bandas quando utilizados individualmente. Neste estudo em particular, verificou-se que apenas o marcador AFY 2 apresentou monomorfismo para as oito bandas amplificadas, o que levou à sua exclusão nas análises. Por outro lado, o marcador AFY 3 que não amplificou no trabalho onde originalmente foi descrito, mostrou-se altamente informativo em nossas buscas, com a amplificação de 17 bandas, sendo 14 delas polimórficas evidenciando abundância de retrotransposons em diferentes subgrupos dentro de *M. esculenta*. Os marcadores AYF 6, AYF 7, AYF 10 e AYF 11 também não obtiveram sucesso na amplificação. Os marcadores AFY 3, AFY 5, AFY 9 e AFY 12 destacaram-se como os mais informativos para distinguir os genótipos com subsessilidade foliar, M1 e M2.

O resultados obtidos com os marcadores associados a técnica rep-PCR apresentaram diferenças significativas em comparação com o dendrograma gerado pelos marcadores IRAP-PCR. A divergência encontrada de dendrograma pode ser atribuída à origem dos marcadores, sendo um de cobertura nuclear e o outro mitocondrial. Embora a técnica rep-PCR seja amplamente utilizada em procariotos (LUPISKI; WEINSTOCK, 1992; MICHELIN et al., 2008), nos últimos anos tem sido empregada em plantas para distinguir diferentes linhagens

de esterilidade masculina citoplasmática (CMS) em *Brassica juncea* (ASHUTOSH et al., 2005), aplicada no estudo da diversidade do genoma mitocondrial em *Carthamus tinctorius* L (VISWANATHASWAMY; NIZAMPATNAM, 2013) e na diversidade em Euphorbiaceae (RAMPADARATHA et al., 2015). Agora, pela primeira vez, essa técnica está sendo testada na espécie *M. esculenta*, o que evidencia mais uma ferramenta disponível para explorar a diversidade genética com base em variações interespecíficas dentro do gênero *Manihot* e intraespecíficas *M. esculenta*.

A análise anatômica dos dados apresentados exige cautela e investigações complementares, uma vez que os resultados preliminares deste estudo, especialmente em relação aos pecíolos curtos, contrastam com o conhecimento atual da anatomia sobre a espécie *Manihot esculenta* Crantz e outras espécies do mesmo gênero. Isso levanta várias hipóteses e perguntas que estimulam diversas direções de pesquisa a serem exploradas. Por exemplo, é plausível inferir que esse fenótipo possa desempenhar um papel na indução de respostas mais favoráveis nessas plantas, devido ao percurso mais curto se comparado aos genótipos com pecíolos longos. Caso essa hipótese seja confirmada, essa característica poderá ser explorada tanto dentro da espécie quanto em outras culturas por meios ferramentas de edição gênica.

A arquitetura do dossel dos genótipos M1 e M2 do tipo 'bouquet' provavelmente deve ser um fator primário-chave que desencadeia o sombreamento parcial das folhas e possivelmente modula positivamente os índices de clorofila dessas plantas, indicando que possivelmente deve existir alguma vantagem na taxa fotossintética. Nessas plantas, é perceptível um sombreamento parcial em contraste com uma excessiva exposição a radiação solar no genótipo de pecíolo longo, C4. Porém estudos adicionais serão conduzidos para validar com cautela todas inferências relacionadas ao índice de clorofila superior nos variantes. Além disso, a compactação típica nesse tipo de arquitetura em campo pode permitir um maior adensamento de plantas por hectare.

Liu et al. (2020) conduziram um estudo que investigou o efeito do sombreamento nas plantas de *Camellia sinensis*. Eles observaram mudanças significativas na expressão de genes envolvidos na biosíntese dos cloroplastos, assim como nos níveis hormonais influenciados pelo sombreamento, que desempenham um papel regulador na produção de clorofila nas folhas de chá. Pesquisas posteriores revelaram que o sombreamento intenso, níveis de 95% e 99,5%, resultou no acúmulo de carotenóides e no aumento do teor de clorofila nas folhas. Além disso, as plantas de chá mostraram características adaptativas a



ambientes sombreados, ao invés de exibirem uma resposta evasiva tradicional ao sombreamento. Genes associados à síntese de carotenoides, tais como *CsdxS1*, *CsDxS3*, *CsPSY*, *CslcyB* e *CslcyE*, apresentaram alta expressão, contribuindo para o aumento de carotenóides nas folhas (Fu et al., 2022). Esses resultados sugerem que os genótipos em estudo podem estar se comportando de maneira semelhante devido às suas características fenotípicas, que resultam em um parcial sombreamento natural das folhas.

Estudos prévios já evidenciaram descobertas similares, demonstrando aumento no teor de clorofila em culturas como *M. esculenta* (JHOSTON, 1998) e soja quando expostas a condições de sombreamento e seca (ZHANG et al., 2016). Essas constatações corroboram os resultados deste estudo, em que os genótipos com folhas subsésseis M1 e M2, exibiram níveis significativamente mais elevados de clorofila total, clorofila *B* e Índice de Balanço de Nitrogênio em comparação com os genótipo comum, C4. As variedades cultivadas de soja passaram por longo processo de seleção e investigação ao longo do tempo, levando à identificação de genes recessivos responsáveis pelo pecíolo curto (YOU et al., 1998; JUN; KANG, 2012). Essa mutação na soja trouxe benefícios, como uma estrutura de dossel mais eficiente em termos de sombreamento em comparação com os genótipos de pecíolos longos, maior rendimento no campo devido à maior densidade de plantas por metro quadrado e maior produtividade devido a uma capacidade fotossintética aprimorada (LIU et al., 2019; BAO et al., 2019). Castricini et al. (2016) conduziram estudos que relataram altas concentrações de carotenoides e vitamina C em um genótipo de mandioca também chamado popularmente de ‘Aipim Abacate’. No entanto, não foram encontradas informações específicas sobre as características desse genótipo, que apesar do nome, se trata de um material diferente do genótipo M2, que tem sido investigado nessa pesquisa e pertence ao BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Em relação ao fenótipo de subsessilidade e seu potencial para acumular características economicamente valiosas para o melhoramento genético, as evidências disponíveis para plantas cultivadas, estão limitadas à soja. A complexa interação de fatores internos específicos de cada espécie pode influenciar o comprimento, a forma e o desenvolvimento dos pecíolos em diferentes culturas, representando um desafio significativo para as investigações sobre *M. esculenta*, devido à escassez de estudos abrangentes sobre genótipos subsésseis. No entanto, os dados coletados em campo, a temperatura térmica baixa, juntamente com os valores de clorofila total e *b* associados às diferenças observadas na anatomia dos pecíolos curtos e lâminas foliares, parecem indicar uma capacidade

fotossintética aprimorada e uma maior tolerância ao calor nos genótipos mutantes (M1 e M2), abrindo caminho para novos estudos subsequentes.

Estudos comparativos da anatomia, biologia molecular e aspectos fisiológicos dos pecíolos longos e curtos nesses genótipos foram fundamentais para obter uma compreensão preliminar das implicações desse fenótipo atípico em *M. esculenta*. Os resultados apresentados nesta pesquisa representam uma parte das várias abordagens utilizadas para investigar as características genéticas e agrônômicas dos genótipos com pecíolos subsésseis, que ainda estão em processo de exploração.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foram registradas e analisadas as características fenotípicas, moleculares e fisiológicas de dois genótipos de *Manihot esculenta*, Makcugý e Aipim Abacate, com foco na subsessilidade foliar apresentada por ambos, sendo este um fenótipo atípico na espécie. Nos genótipos variantes, a peculiar arquitetura do dossel tipo ‘bouquet’ surge como um atributo agrônômico atrativo que possibilitaria um aumento da população de plantas por hectare. Além disso, essas plantas apresentam potencialidades a nível fisiológico, que somadas ao adensamento em campo, poderiam atingir maiores rendimentos na produção de raízes. Por fim, os resultados desse estudo estimulam a realização de investigações adicionais a nível do transcriptoma e proteoma desses genótipos, pois é fundamental o mapeamento do(s) fator(e)s genético(s) que controlam esse fenótipo em *M. esculenta*, para expandir as potencialidades dessa cultura com a modulação do desenvolvimento peculiar mediante Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMELEWORK, A. B.; BAIRU, M. W. Advances in genetic analysis and breeding of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): A review. **Plants**, v. 11, n. 12, 2022.

ASHUTOSH; DWIVEDI, K K; KUMAR, V DINESH; PRAKASH, S; BHAT, S R. rep-PCR helps to distinguish different alloplasmic cytoplasmic male sterile lines of *Brassica juncea*. **Plant Science**, v. 168, n. 4, p. 1083–1087, 2005.

BAO, A.; CHEN, H.; CHEN, L.; CHEN, S.; HAO, Q.; GUO, W.; QIU, D.; SHAN, Z.; YANG, Z.; YUAN, S.; ZHANG, C.; ZHANG, X.; LIU, B.; KONG, F.; LI, X.; ZHOU, X.; TRAN, L.-SON P.; CAO, D. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmSPL9 genes alters plant architecture in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 131, 2019.

BARROS, N. E. F. DE. Diversidade genética em cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) da região Amazônica, padrões de qualidade amilolítica e expressão gênica a amilase. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo/SP. n. July, p. 104, 2011.

CASTRICINI, A; RODRIGUES, G V; JESUS, A M; SERPA, M. F. P. Caracterização de raízes de genótipos de mandioca produzidos no semiárido de Minas Gerais. **Revista Raízes e Amidos Tropicais Unesp**, v. 10, n. 1808– 981X, p. 23–37, 2014.

CEBALLOS, H.; SÁNCHEZ, T.; MORANTE, N.; FREGENE, M.; DUFOUR, D.; SMITH, A. M.; DENYER, K.; PÉREZ, J. C.; CALLE, F.; MESTRES, C. Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7469–7476, 2007.

COUTO, E. M. Caracterização De Cultivares De Mandioca Do Semi-Árido Mineiro. 2013. 118 f. **Tese** (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras- MG, Lavras, MG, 2013.

DA COSTA NUNES, E. et al. Physico-chemical profiling of edible or sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starches from Brazilian germplasm. **Food Bioscience**, v. 43, n. August, p. 101305, 2021.

DA SILVEIRA, T. C.; MARTINS, M. L. L.; RODY, H. V. S.; OLIVEIRA, L. O. DE. Evolutionary history of *Manihot carthagenensis* (Euphorbiaceae) and allied species in eastern South America. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 132, p. 207–218, 2019.

DE CARVALHO, R. R. B. et al. Image-based phenotyping of cassava roots for diversity studies and carotenoids prediction. **PLoS ONE**, v. 17, n. 1 January, p. 1–25, 2022.

DOS SANTOS, C. S. et al. Genome-wide association study of cassava starch paste properties. **PLoS ONE**, v. 17, n. 1 January, 2022.

DOYLE, J E DOYLE, JL (1987). Um procedimento rápido de isolamento de DNA para pequenas quantidades de tecido foliar fresco. **Boletim Fitoquímico**, 19, 11-15.

EL-SHARKAWY, M. A.; COCK, J. H.; PORTO, M. C. M. Características fotossintéticas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, v. 1, n. 2, p. 143-154,

1989.

FAVERO, D. S. et al. AT-Hook Transcription Factors Restrict Petiole Growth by Antagonizing PIFs. **Current Biology**, v. 30, n. 8, p. 1454- 1466.e6, 2020.

FERREIRA, D. F. 2011. SISVAR: A Computer Statistical Analysis System. *Ciência e Agrotecnologia* 35(6): 1039-1042. doi: 10.1590/S1413-70542011000600001

GLEADOW, R.; MAHER, K.; CLIFF, J. Cassava. **Current biology: CB**, v. 33, n. 10, p. R384–R386, 2023.

GRACIANO-RIBEIRO, D.; HASHIMOTO-FREITAS, D. Y.; NASSAR, N. M. A. Comparative petiole anatomy of cassava (*Manihot*) species. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, 2016.

GRACIANO-RIBEIRO, D; HASHIMOTO, D. Y. C; NOGUEIRA, L. C; TEODORO, D; MIRANDA, S. F; NASSAR, N. M. A. Internal phloem in an interspecific hybrid of cassava, an indicator of breeding value for drought resistance. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 8, n. 3, p. 1139–1146, 2009.

HOWELER, R. H. (ED.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Um novo futuro para a mandioca na Ásia. Seu uso é um alimento liberado e combustível para beneficiar os pobres. CIAT, **Programa Mandioca, Bangkok, TH**. 803 p, 2008

HUA-WEI, G. A. O. Characterization of the petiole length in soybean compact architecture mutant M657 and the breeding of new lines *Journal of Integrative Agriculture*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 21, Ed. 9, P. 2508-2520, 2022.

ISODA, A.; MORI, M.; MATSUMOTO, S.; LI, Z.; WANG, P. High yielding performance of soybean in northern xinjiang, China. **Plant production science**, v. 9, n. 4, p. 401–407, 2006.

JOHNSTON, M.; ONWUEME, I. C. Effect of shade on photosynthetic pigments in the tropical root crops: Yam, taro, Tannia, cassava and sweet potato. **Experimental agriculture**, v. 34, n. 3, p. 301–312, 1998.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Voudoise des Sciencies Natureller**, n.37, p.547- 579, 1901.

JUN, T. H.; KANG, S. T. Genetic map of *lps3*: A new short petiole gene in soybeans. **Genome**, v. 55, n. 2, p. 140–146, 2012.

JUN, T-H.; KANG, S-T.; MOON, J-K.; SEO, M-J.; YUN, H-T.; LEE, S-K.; LEE, Y-H.; KIM, S-J. Genetic analysis of new short petiole gene in soybean. **Journal of crop science and biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 87–89, 2009.

KILEN, T. C. Inheritance of a Short Petiole Trait in Soybean 1. **Crop Science**, v. 23, n. 6, p. 1208–1210, 1983.

KUHN, B C; MANGOLIN, C A; SOUTO, E R; VICIENT, C M; MACHADO, M F P S.

Development of retrotransposon-based markers IRAP and REMAP for cassava (*Manihot esculenta*). **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 15, n. 2, 2016.

LI, Y.; KANG, X.; ZHOU, J.; ZHAO, Z.; ZHANG, S.; BU, H.; QI, W. Geographic variation in the petiole-lamina relationship of 325 eastern Qinghai-Tibetan woody species: Analysis in three dimensions. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 748125, 2021.

LIU, L.; LIN, N.; LIU, X.; YANG, S.; WANG, W.; WAN, X. From chloroplast biogenesis to chlorophyll accumulation: The interplay of light and hormones on gene expression in *Camellia sinensis* cv. Shuchazao leaves. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 256, 2020.

LIU, M.; WANG, Y.; GAI, J.; BHAT, J. LI, Y.; KONG, J.; ZHAO, T. Genetic analysis and gene mapping for a short-petiole mutant in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Agronomy (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 11, p. 709, 2019.

LUPISKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M.; Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 1992;174:4525–9.

MICHELIM, L.; MULLER, G.; ZACARIA, J.; DELAMARE, A. P. L.; DA COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 423–429, 2008.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 319–328, 2000.

MWANAMWENGE, J.; SIDDIQUE, K. H. M.; SEDGLEY, R. H. Canopy development and light absorption of grain legume species in a short season Mediterranean-type environment. **Journal of agronomy and crop science**, v. 179, n. 1, p. 1–7, 1997.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, n. 10, p. 5269–5273, 1979.

NIINEMETS, Ü.; FLECK, S. Petiole mechanics, leaf inclination, morphology, and investment in support in relation to light availability in the canopy of *Liriodendron tulipifera*. **Oecologia**, v. 132, n. 1, p. 21–33, 2002.

RAMPADARATH, S.; PUCHOOA, D.; BAL, S. Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) as a genetic tool to study interspecific diversity in Euphorbiaceae family. **Electronic journal of biotechnology: EJB**, v. 18, n. 6, p. 412–417, 2015.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: Principles and selected methods**. Melbourne, Australia: Termarcarphi, 1981.

SILVA, L. R. de O. Anatomia e histoquímica do gênero *Manihot* mill. 2013. 118 f. Dissertação de mestrado em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura- BA, 2016.

THOMAS, J. F.; RAPER, C. D. Jr. Internode and petiole elongation of soybean in response to photoperiod and end-of-day light quality. **Botanical Gazette** (Chicago, Ill.), v. 146, n. 4, p. 495–500, 1985.

TSUKAYA, H.; KOZUKA, T.; KIM, G.-T. Genetic control of petiole length in *Arabidopsis thaliana*. **Plant & cell physiology**, v. 43, n. 10, p. 1221–1228, 2002.

VISWANATHASWAMY, D. K.; NIZAMPATNAM, N. R. Rep-PCR identifies both inter- and intra-specific mitochondrial genome differences in *Carthamus*. **Plant Molecular Biology reporter**, v. 31, n. 5, p. 1150–1156, 2013.

YOU, M.; ZHAO, T.; GAI, J.; YEN, Y. **Euphytica; Netherlands journal of plant breeding**, v. 102, n. 3, p. 329–333, 1998.

ZHANG, J; LIU, J; YANG, C; DU, S; YANG, W. Photosynthetic performance of soybean plants to water deficit under high and low light intensity. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 279–287, 2016.

## TABELAS

**Tabela1** Descrição dos genótipos usados no estudo

Descrição	Genótipos	Fenótipo do pecíolo	Fonte
M1	Makcugý	Pecíolo curto	Santa Teresa/ES
M2	Aipim Abacate	Pecíolo curto	BAG/ Embrapa Mandioca e Fruticultura
C1	BGM - 0541	Pecíolo longo	BAG/ Embrapa Mandioca e Fruticultura
C2	BGM - 0687	Pecíolo longo	BAG/ Embrapa Mandioca e Fruticultura
C3	BGM - 0040	Pecíolo longo	BAG/ Embrapa Mandioca e Fruticultura
C4	Cacau branca	Pecíolo longo	Alegre/ES



**Tabela 2** Lista dos oligonucleotídeos usados no trabalho

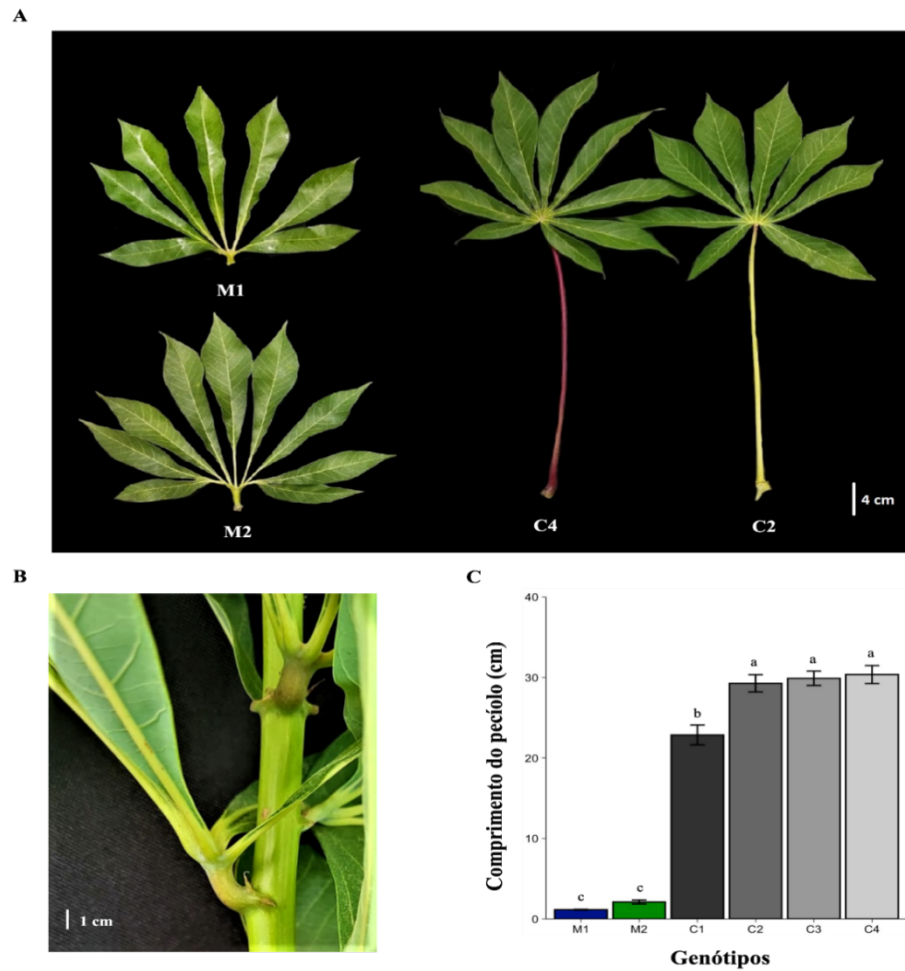
<b>Identificação</b>	<b>Tipo de seqüências</b>	<b>Seqüências (5'→3')</b>	<b>Referências</b>
REP-F	Palindromic sequence	IIICGICGICATCIGGC	ASHUTOSH et al., 2005
REP-R	Palindromic sequence	ICGICTTATCIGGCCTAC	ASHUTOSH et al., 2005
BOX	Mosaic repetitive element	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	ASHUTOSH et al., 2005
ERIC-F	Mosaic repetitive element	ATGTAAGCTCCTGGGTCAC	ASHUTOSH et al., 2005
ERIC-R	Mosaic repetitive element	AAGTAAGTGACTGGGAGCG	ASHUTOSH et al., 2005
IRAP AFY 1	Retrotransposons	TGGCGATGGCCGCGATCCTAGG	KUHN et al., 2016
IRAP AFY 2	Retrotransposons	CATGCTTGTCTCGCATGTCTCTC	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 3	Retrotransposons	CTATTCGCCAACAGCTTCGGCA	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 4	Retrotransposons	CTGAGCGCCAACAGCTTCGGCCAG	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 5	Retrotransposons	AGCCTGGCGATGGCCGCGATCC	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 6	Retrotransposons	CATTATGGGCCGATCTGAGGCC	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 7	Retrotransposons	ACGTATTATCGTATTGAACAAG	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 8	Retrotransposons	CTGTACCTCGTTGATCGGAACC	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 9	Retrotransposons	CTGGGGTCGGATAATCTCTGA	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 10	Retrotransposons	GAG ATA GTG TAT TCT ATA AAC	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 11	Retrotransposons	TCCTATTCAATATAGAAGTTAC	KUHN et al., 2016
IRAP AYF 12	Retrotransposons	GTCCTCGCATGTCTCTCTCTTC	KUHN et al., 2016

**Tabela 3** Quantificação dos fragmentos amplificados com os marcadores moleculares rep-PCR e IRAP para a espécie *M. esculenta*.

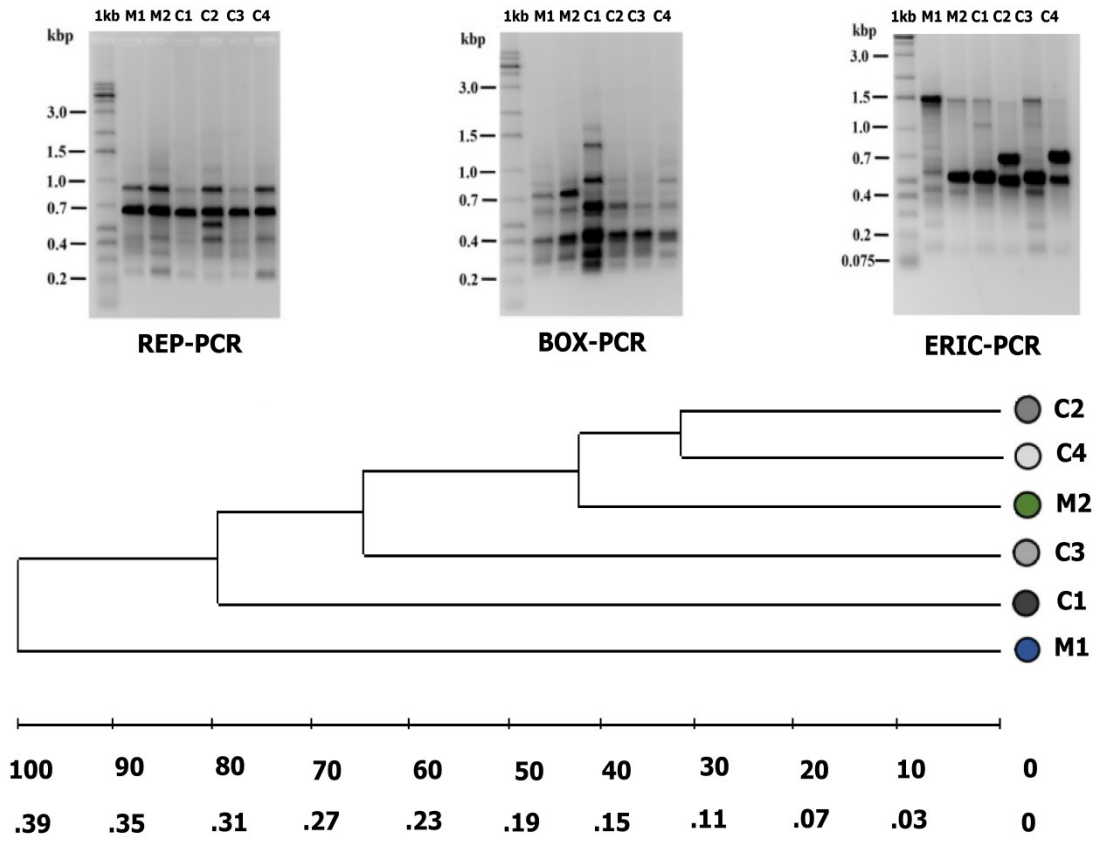
<b>Olgonucleotídeos</b>	<b>TBA</b>	<b>TBP</b>	<b>%BP</b>	<b>TFPB (min-máx)</b>
REP	8	3	38%	100-1200
BOX	11	5	45%	250-1700
ERIC	13	10	77%	100-1500
IRAP-AFY 1	8	4	50%	300-2800
IRAP-AFY 3	17	14	82%	250-2300
IRAP-AFY 4	10	1	10%	400-1500
IRAP-AFY 5	10	5	50%	700-2300
IRAP-AFY 8	5	1	20%	600-1200
IRAP-AFY 9	7	4	57%	250-3000
IRAP-AFY 12	8	2	25%	350-1300
<b>Total:</b>	97	49	-	-

TBA: Número total de bandas amplificadas. TBP: Número total de bandas polimórficas (TBP). %BP: Porcentagem de bandas polimórficas. TFPB: Tamanho dos fragmentos obtidos em pares de bases.

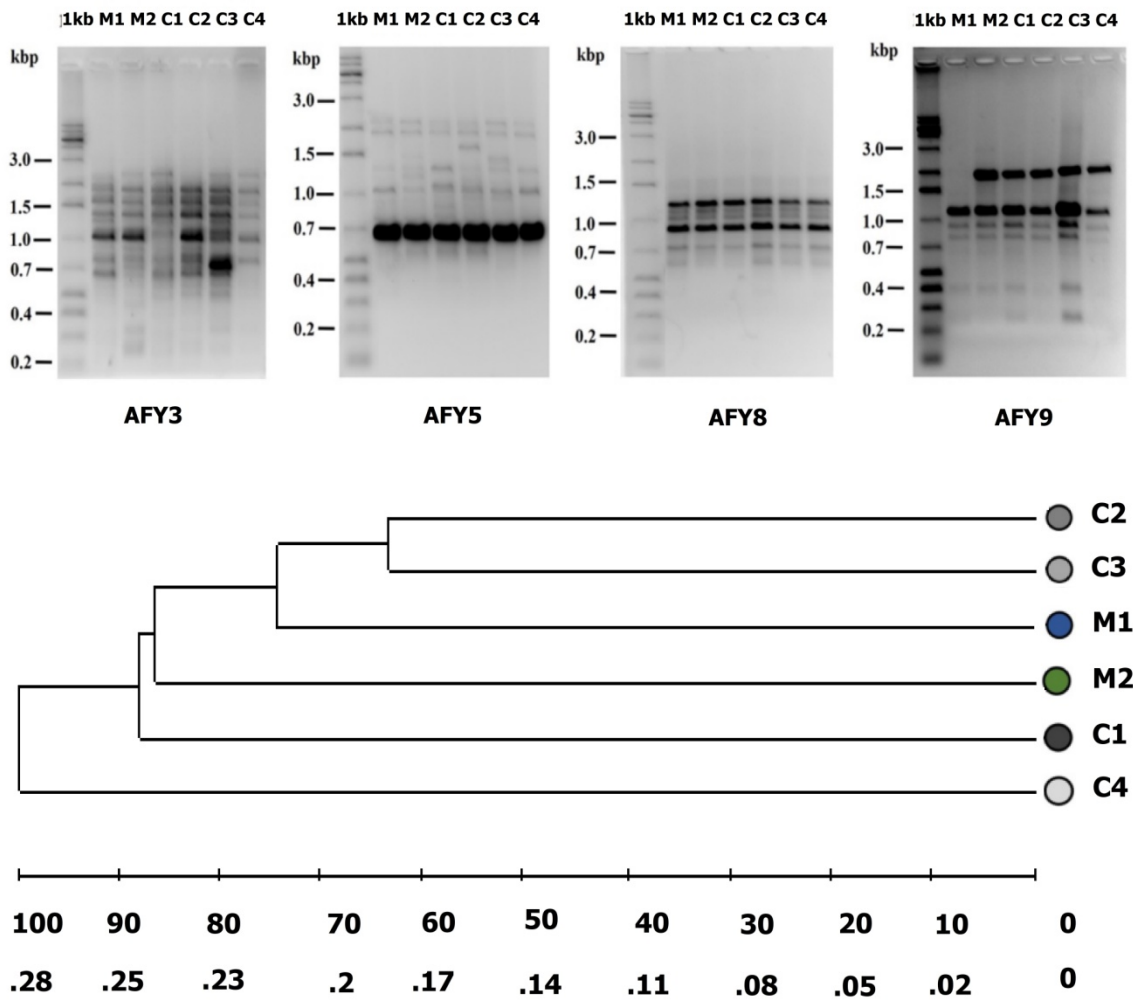
## FIGURAS



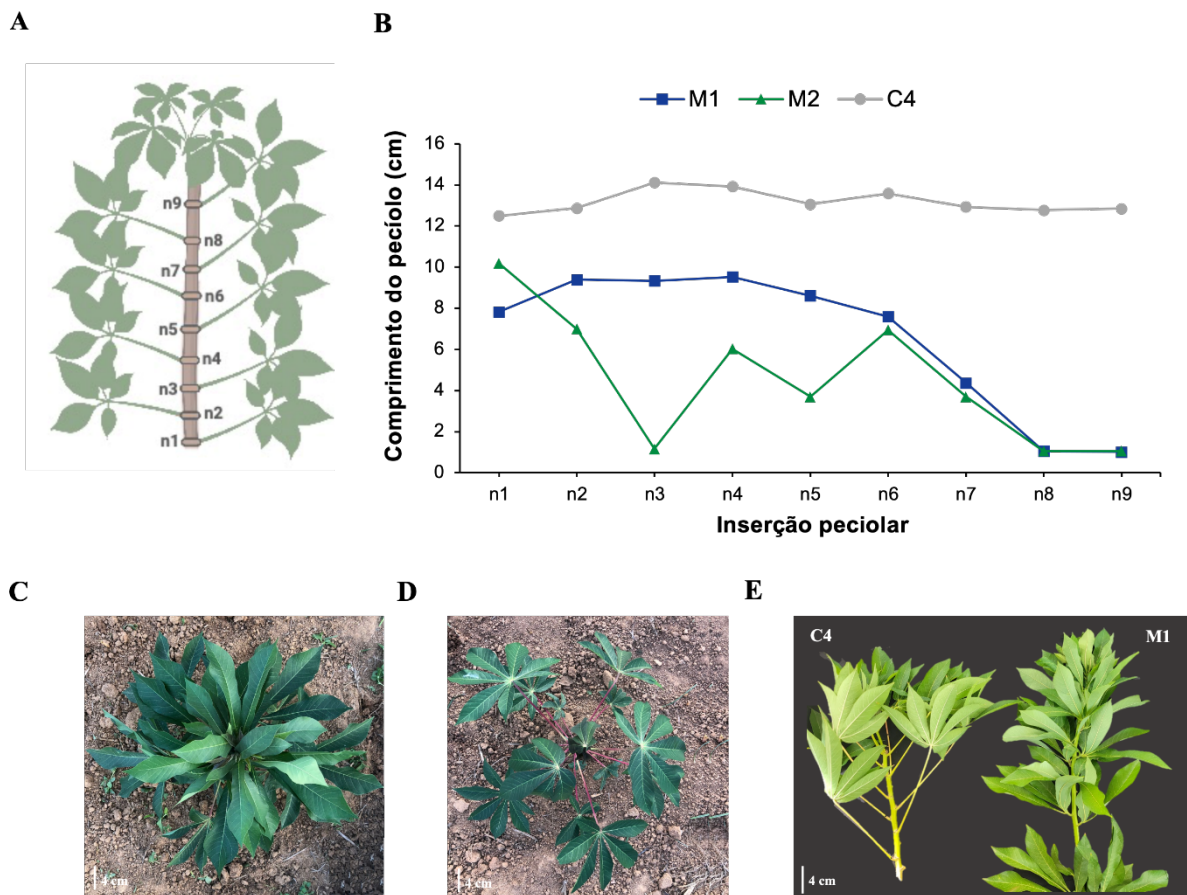
**Fig. 1** Caracterização fenotípica de seis genótipos de *M. esculenta* contrastantes para a característica de crescimento peciolar em folhas expandidas. (A) Imagens representativas dos grupos de genótipos com pecíolo curto (M1 e M2) e pecíolo longo (C4 e C2). (B) Imagem representativa da morfologia do pecíolo curto. (C) Média fenotípica do comprimento do pecíolo nos genótipos M1, M2, C1, C2, C3 e C4 cultivados em campo por seis meses. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de três repetições biológicas e cinco repetições técnicas. Nível de significância teste Scott-Knott, p-value 0,05



**Fig. 2** Dendrograma de seis genótipos de *M. esculenta* contrastantes para o fenótipo de subessilidade foliar obtido a partir da análise de marcadores moleculares rep-PCR. (A) Perfil de bandas amplificadas com cada um dos marcadores (REP, BOX, ERIC). (B) Índice de dissimilaridade de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA.

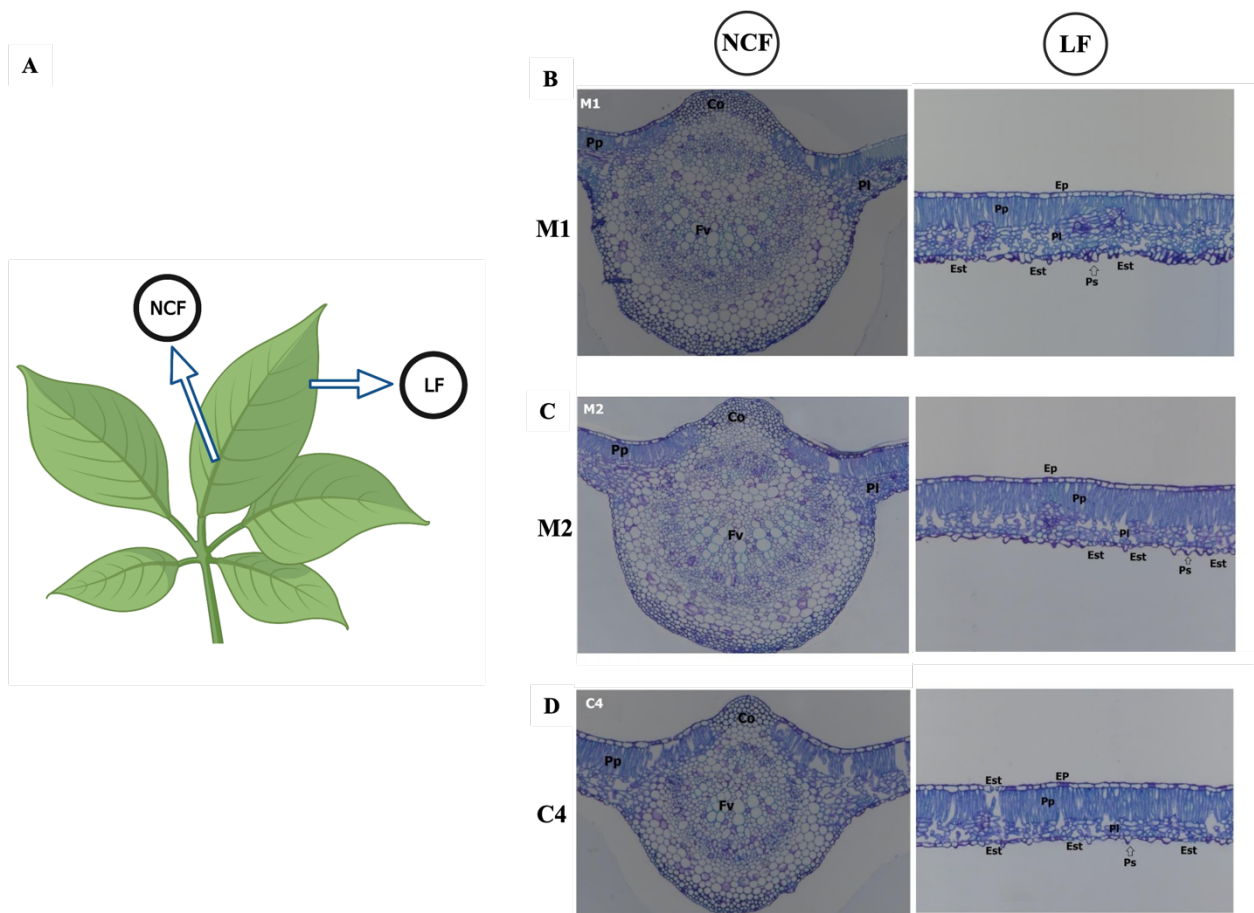


**Fig 3** Dendrograma de seis genótipos de *M. esculenta* contrastantes para o fenótipo de subsessilidade foliar obtido a partir da análise de marcadores moleculares IRAP. (A) Perfil de bandas amplificadas com cada um dos marcadores (AYF3, AYF5, AYF8 e AYF9). (B) Índice de dissimilaridade de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA.



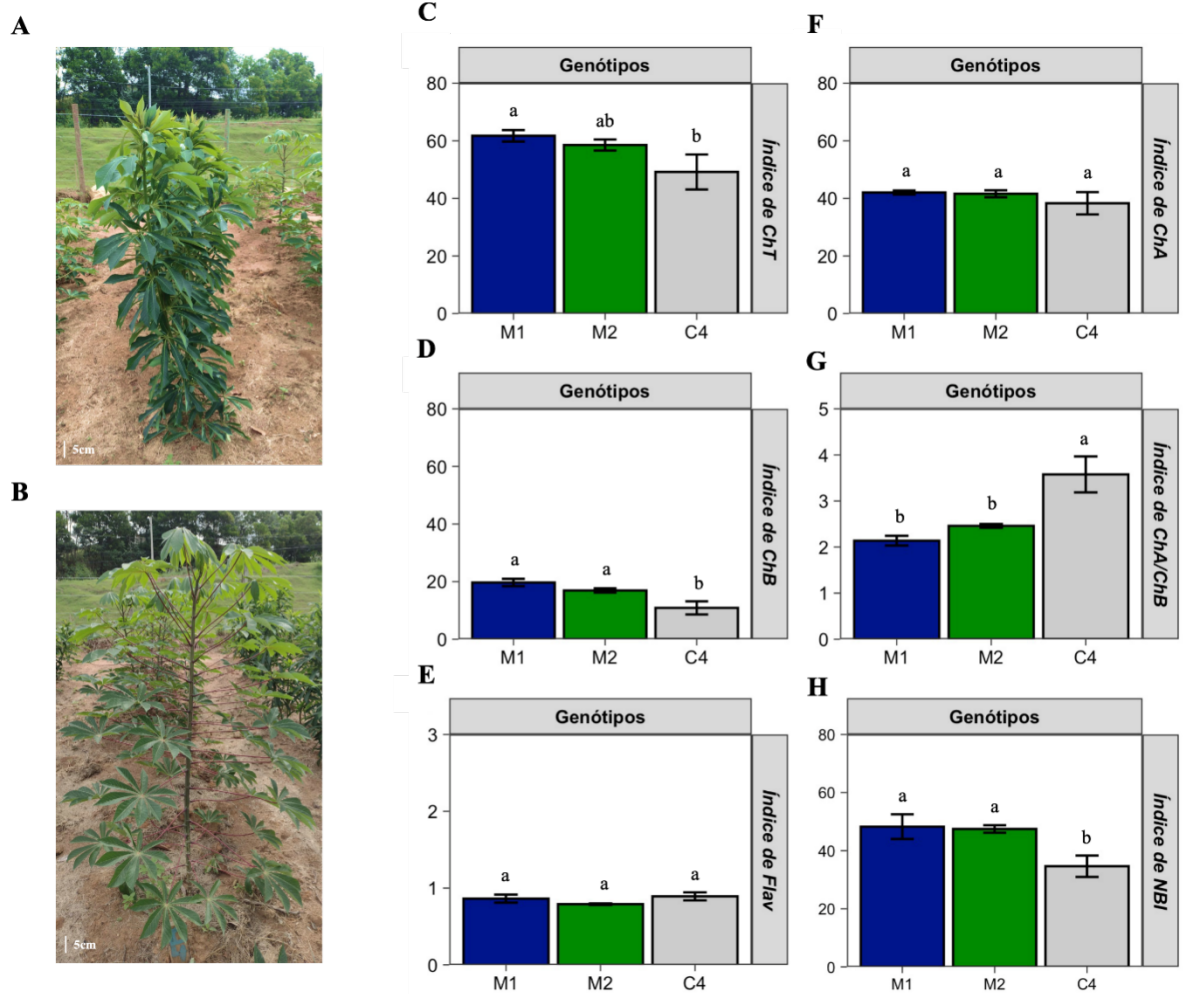
**Fig. 4** Catacterização fenotípica do gradiente de crescimento peciolar dos genótipos contrastantes M1, M2 e C4. (A) Imagem ilustrativa para representar os pecíolos que foram avaliados em cada nó. (B) Perfil do gradiente de crescimento peciolar até a completa estabilização do fenótipo de subsessilidade nos genótipos M1 e M2. As plantas foram cultivadas em solo e as medições foram conduzidas 28 dias após as primeiras brotações. O experimente foi realizado com três repetições biológicas e três repetições técnicas. (C) Arquitetura do dossel do genótipo M1, caracterizada como tipo ‘bouquet’. (D) Arquitetura do dosel do genótipo M2. (E) Imagem comparativa para representar as diferenças morfológicas entre o genótipo de pecíolo curto (M1) e pecíolo longo (C4)



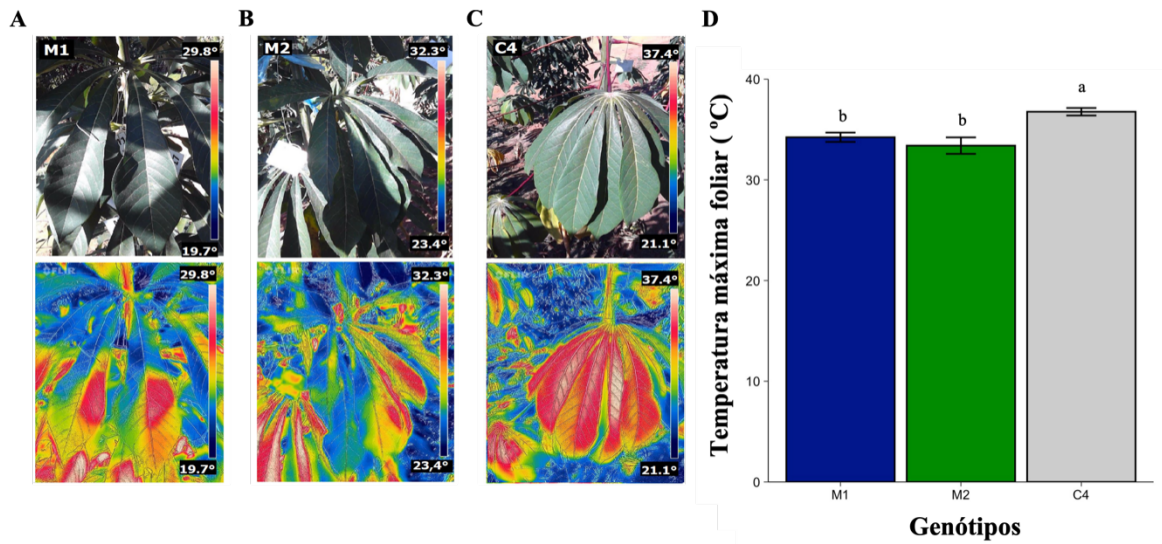


**Fig. 6** Secção transversal de microestruturas da nervura foliar central e lâmina foliar nos genótipos M1, M2 e C4. (A) Representação esquemática dos pontos de coleta. NCF: nervura central foliar. LF: lâmina foliar. Genótipos analisados (B) M1, (C) M2 e (D) C4. Est: estômato. Pp: parênquima paliçádico. Pl: parênquima lacunoso. Ep: Epiderme. Co: colênquima. Fv: feixes vasculares. Ps: Papilas





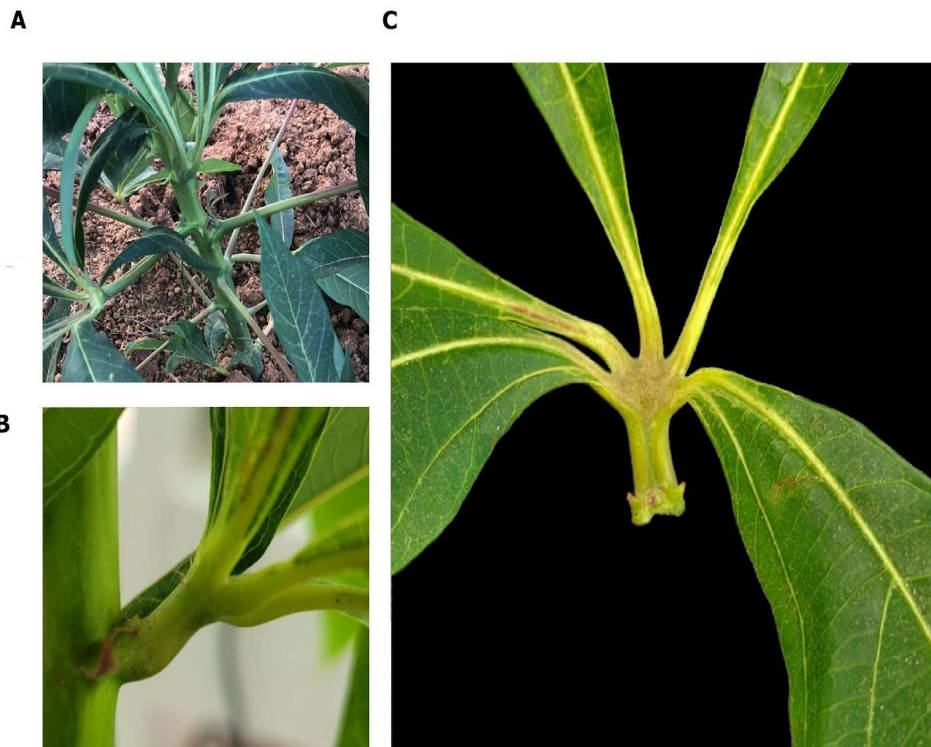
**Fig. 7** Determinação dos índices de clorofila, flavonóides e balanço de nitrogênio em genótipos contrastantes para o desenvolvimento peciolar. As análises foram conduzidas em plantas com quatro meses de idade cultivadas em campo experimental. Imagens representativas das plantas em campo experimental (A) genótipo M1 e (B) genótipo C4. Média dos índices fisiológicos (C) Índice de clorofila total (ChT). (D) Índice de clorofila B (ChB). (E) Índice de flavonóides (Flav). (F) Índice de clorofila A (ChA). (G) Relação do índice de clorofila A/ índice de clorofila B (ChA/ChB). (H) Índice do balanço de nitrogênio. Nível de significância teste de Tukey, p-value 0,05



**Fig. 8** Análise da temperatura foliar mínima e máxima dos genótipos (A) M1, (B) M2 e (C) C4. As análises de temperatura foliar foram conduzidas em plantas com quatro meses de idade. (D) Gráfico com as médias obtidas da temperatura máxima foliar de cada genótipo. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de três repetições biológicas e cinco repetições técnicas. Nível de significância teste Scott-Knott, p-value 0,05

**A****B**

**Fig. S1** Comparativo da senescência das folhas C4 e M2. Imagem (A) folhas caídas no chão. (B) M2- Folhas secas presas no caule



**Fig. S2** (A) Gradiente de crescimento peciolar no genótipo M1. (B) Imagem ampliada do fenótipo de subsessilidade estabilizado em folhas expandidas 28 dias após as primeiras brotações do genótipo M1. (C) Imagem ampliada do fenótipo de concavidade observada no pecíolo curto dos genótipos apresenta subsessilidade