UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

NATÁLIA EUDES FAGUNDES DE BARROS

Diversidade genética em cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) da Região Amazônica, padrões de atividade amilolítica e expressão gênica de α-amilase

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

SÃO PAULO 2011 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Barros, Natália Eudes Fagundes de

B277d Diversidade genética em cultivares de mandioca (Manihot esculenta) da Região Amazônica, padrões de atividade amilolítica e expressão gênica de α-amilase / Natália Eudes Fagundes de Barros. -- São Paulo, 2011.

91p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientador: Finardi Filho, Flavio

1. Bioquímica dos alimentos 2. Amilase : Ciências dos alimentos 3. Vegetais : Preservação : Tecnologia de alimentos I. T. II. Finardi Filho, Flavio, orientador.

641.1 CDD

Natália Eudes Fagundes de Barros

Diversidade genética em cultivares de mandioca (Manihot esculenta) da Região Amazônica, padrões de atividade amilolítica e expressão gênica de α -amilase

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Antonia M. Iguti

Prof. Dr. Lázaro Eustáquio P. Peres

Prof. Dr. Manuel Troyano Pueyo

Profa. Dra. Ursula M. Lanfer Marquez

São Paulo, 12 de Setembro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, e ao apoio financeiro da FAPESP e Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Flavio Finardi Filho pela orientação concedida no curso, e pelo apoio em todos os momentos ao longo dessa trajetória.

Agradeço o apoio concedido por todos os laboratórios por onde passei nas etapas experimentais deste trabalho, especialmente Planta Piloto V e Laboratório de Cromatografia (Embrapa), Laboratório de Biodegradação (Instituto Nacional de Tecnologia/RJ) e Laboratório de Biologia Molecular (Instituto de Química/UFRJ). Agradeço às amigas do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da FCF/USP Valdinéia, Cintia, Helena, Giovana, Beatriz, Sinara, Joana, e Tatiana. Agradeço à Drª Edna Oliveira pela acolhida no laboratório de Diagnóstico Molecular (Embrapa) nesses seis anos, onde eu tive o mais valioso aprendizado deste curso: profissionalismo ético e humano na difícil carreira acadêmica. Obrigada pelo

Agradeço a todos os amigos da Embrapa Agroindústria de Alimentos, pelo fabuloso ambiente de trabalho, e pelo apoio. Em especial: Andrea Matos, Otniel Freitas, Tatiane Correa, Ivanilda, Thiago Ferreira, Hemylson, Thiago Nogueira, Kelly, Gabriela, Cinthia, Camila, Roberta, Felipe, Flávio Quitério, e Ana Paula.

exemplo, pela orientação, e pela amizade.

Agradeço a todos os colegas de trabalho que tive ao longo da minha ainda embrionária carreira profissional, principalmente aos amigos Marcelo Tinoco e Cátia. Agradeço a todos os amigos com as quais compartilhei minhas aflições, frustrações, alegrias, surpresas e contentamentos.

Agradeço ao meu pai Fagundes e meu irmão Henrique, por acreditarem e me apoiarem incondicionalmente, e pelo amor sem medida.

Agradeço in memorian a minha amada mãe Terezinha, que tanto contribuiu na minha caminhada profissional. A tristeza de não tê-la na platéia da defesa desaparece quando lembro a alegria na lista de aprovados no processo seletivo. Agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida pela força de arriscar, resistir e perseverar neste sonho.

Da manga rosa

Quero o gosto e o sumo.

Melão maduro, sapoti, juá.

Jaboticaba, teu olhar noturno;

Beijo travoso de umbú cajá.

Alceu Valença (Tropicana)

RESUMO

BARROS, N. E. F. de. Diversidade genética em cultivares de mandioca (*Manihot* esculenta) da Região Amazônica, padrões de atividade amilolítica e expressão gênica de α-amilase. São Paulo, 2011. Tese (doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A mandioca (Manihot esculenta Crantz), apesar de ser muito cultivada e consumida no país, é uma planta da qual se conhece pouco sobre características intrínsecas do vegetal e as transformações bioquímicas que ocorrem em suas raízes tuberosas. Os traços fenotípicos das raízes foram usados para classificações empíricas, mas o emprego de técnicas de biologia molecular ainda é pouco utilizado para mostrar novos marcadores moleculares que poderiam identificar, além de traços agronômicos, fatores nutricionais, sensoriais e de qualidade que afetam essas raízes comestíveis. A participação de enzimas endógenas, como a α-amilase, pode estar relacionada com o processo de deterioração pós-colheita, no caso, fornecendo energia para o desenvolvimento microbiano. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a diversidade genética entre cultivares de mandioca, as expressões gênicas de α-amilase e da amido-sintase ligada ao grânulo, e a atividade amilolítica total. Amostras de variedades de mandioca, consideradas doce, foram coletadas nas reservas indígenas de Juruti e Caxiuanã, PA, e mantidas na Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ). Para as análises de diversidade genética, foi extraído o DNA de folhas de 30 amostras e utilizado como molde em PCR-RAPD, a partir de 20 oligonucleotídeos do conjunto Operon W. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e fotodocumentados. Os padrões obtidos por PCR-RAPD foram agrupados através de coeficiente de Pearson e expressos sob dendograma. As análises por RAPD, utilizando o oligonucleotídeo OPW-12, permitiram a distinção das variedades e demonstraram alto grau de similaridade genética entre as amostras de mandioca avaliadas, permitindo a identificação de três grupos. Nestes grupos, estão distribuídas 28 das 30 amostras analisadas, com 75% de similaridade genética entre elas. Paralelamente, amostras de raízes das 30

variedades de mandioca foram empregadas em ensaios de determinação da atividade amilásica, sendo observada ampla variação entre as variedades. Igualmente, para os estudos de expressão gênica da α-amilase e *GBSSI*, o RNA total foi extraído a partir das raízes de 30 amostras de mandioca, e utilizado como molde na obtenção de c-DNA e posterior amplificação por RT-PCR em tempo real. A análise da expressão relativa demonstrou discreta variação entre as amostras analisadas. Entretanto, somente a amostra 19 (variedade Açaí-Tinga) apresentou variação expressiva na quantificação relativa (3,18) para *MEAMY*, e as amostras 19 (variedade Açaí-Tinga) e 29 (Jabuti) apresentaram variação expressiva na quantificação relativa de *GBSSI* (4,13 e 2,58 respectivamente).

ABSTRACT

BARROS, N. E. F. de. Diversidade genética em cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) da Região Amazônica, padrões de atividade amilolítica e expressão gênica de α-amilase. São Paulo, 2011. Tese (doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Cassava (Manihot esculenta Crantz) is a worldwide important crop, but some intrinsic feature of this plant remained unclear. Phenotypic characteristics of the roots of cassava are still used to classified them in spite of molecular biology technics to identify agronomic traits, nutritional factors, quality and sensorial parameters of the eatable parts of this plant. Endogenous enzymes, like α -amylase, may be involved on the deteriorative process after harvest by the release of sugars to the microbial proliferation into the roots. The objectives of this study were to use a RAPD assay to identify some DNA variations within and between cassava varieties, expression of αamylase and granule-bound starch synthase gene, as well as amylolitic activity in the roots. Several cassava accessions were collected from indigenous community Caxiuanã and Juruti, state of Pará. The cultivars were grown in EMBRAPA Agrobiologia, state of Rio de Janeiro. Thirty cassava accessions were sampled to prepare DNA templates from cassava leaf. RAPD was performed using twenty commercial primers OPW, and the amplified DNAs for each sample were run in agarose gel. RAPD patterns were grouped following Pearson's coefficient, used to construct a dendogram. RAPD-PCR with primer OPW-12 showed that most varieties of this work showed a very similar fingerprint pattern, indicating that they were likely related. Twenty eight from 30 cassava cultivars analyzed presented more closely genotype, and were distributed into three groups by dendogram. These groups showed similarity coefficient of 75%. Amylolytic activity was determined by quantification of the amount of reducing sugars released during enzymatic reaction with aqueous extract from cassava roots, and variations were observed among cultivars. The evaluation of gene expression showed α -amylase and granule-bound starch synthase genes have been shown to be differentially expressed in some cultivars, with higher expression of *MEAMY* gene on sample 19, Açaí-Tinga variety, and the same sample 19 and 29, Jabuty variety, for *GGSSI* gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Uma das raízes de mandioca brava utilizadas neste estudo03
Figura 2- Aspectos morfológicos da raiz de mandioca
Figura 3- Monômeros de glicose unidos por ligação glicosídica08
Figura 4- Representação molecular (A) e estrutural (B) de amilopectina com ramificações a partir de ligações α-1-4
Figura 5- Representação estrutural da amilose10
Figura 6- Representação da estrutura do grânulo de amido e seus níveis de organização molecular interna amilose e amilopectina
Figura 7- Classificação das enzimas amilolíticas15
Figura 8- Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas α-amilase, β-amilase, glicoamilase, isoamilase e pululanase17
Figura 9- Diagrama da reação de polimorfismos de DNA por
amplificação ao acaso21
Figura 10- Mapa de localização das reservas indígenas
Juruti e Caxiuanã25
Figura 11- Terra preta arqueológica26
Figura 12- Fluxograma da coleta de amostras29
Figura 13- Representação esquemática da PCR utilizada na avaliação capacidade de amplificação do DNA isolado a partir de folhas de mandioca31
Figura 14- Gel de agarose revelado com brometo de etídio com DNA isolado a

i	partir de folha de mandioca (DNeasy)	38
_	15- Gel de agarose, revelado com brometo de etídio, com DNA isolado partir de folha de mandioca (Dellaporta)	
_	16- Gel de agarose, revelado com brometo de etídio, com DNA isolado de amostras de folha de mandioca (DNeasy)	
	17- Gel de agarose, revelado com brometo de etídio, com os produtos amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW01 e o DNA isolado nove amostras de mandioca	de
	18- Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW02 e o DNA isolado nove amostras de mandioca	de
	19- Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW03 e o DNA isolado nove amostras de mandioca	de
	20- Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW04/OPW11, e o DN isolado de nove amostras de mandioca	NΑ
6	21 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW05 e o DNA isolado nove amostras de mandioca	de
	22 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW06 e o DNA isolado nove amostras de mandioca	de
	23 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW07/OPW08, e o DN isolado de nove amostras de mandioca	NΑ

Figura	a 24 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW09 e o DNA isolado	de
	nove amostras de mandioca	49
Figura	a 25 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW10 e o DNA isolado	de
	nove amostras de mandioca	50
Figura	a 26 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW13 e o DNA isolado	de
	nove amostras de mandioca	51
Figura	a 27 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW11/OPW19 e o DN	V۸
	isolado de nove amostras de mandioca	52
Figura	a 28 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW15 e o DNA isolado	de
	nove amostras de mandioca	53
Figura	a 29 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW16 e o DNA isolado	de
	nove amostras de mandioca	54
Figura	a 30 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW17 e o DNA isolado	de
	nove amostras de mandioca	55
Figura	a 31 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW18 e o DNA isolado	de
	nove amostras de mandioca	56
Figura	32 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos	de
	amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW20 e o DNA isolado	de
	nove amostras de mandioca	57

Figura	a 33 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos o amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW12 e o DNA isolado o nove amostras de mandioca	de
Figura	a 34- Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos o amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW12 e o DNA isolado o 30 amostras de mandioca	de
Figura	a 35- Dendograma de similaridade genética das variedades de mandioca6	1
	a 36- Determinação de atividade enzimática e concentração de açúcare totais6	
•	n 37- Quantificação relativa de expressão gênica da amilase e mandioca7	em '0
-	38- Quantificação relativa de expressão gênica da enzima GBSS e	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição nutricional de mandioca crua, por 100 gramas de pa	
Comestive	. 0
Tabela 2- Propriedades gerais de alguns grânulos de amido	.13
Tabela 3- Identificação as amostras coletadas27-	.28
Tabela 4- Período de coleta das nove amostras inicialmente avaliadas quanto	à
diversidade genética	32
Tabela 5- Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR em tempo real	36
Tabela 6- Quantificação dos extratos de DNA	39
Tabela 7- Distribuição genética baseada na matriz de similaridade das amostr	ras
avaliadas neste estudo	62
Tabela 8- Atividade amilolítica em variedades de mandioca selecionadas6	64
Tabela 9- Determinação de açúcares em raízes de mandioca	67
Tabela 10- Expressão relativa para os genes alvo AMY e GBSS	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados

c-DNA DNA complementar

DNA ácido desoxirribonucleico

EB tampão de extração (extraction buffer)

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO Food and Agricultural Organization

GBSS Amido sintase ligada ao grânulo

m-RNA RNA mensageiro

N norte

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

RAPD Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

RFLP Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

RNA ácido ribonucléico

RT-PCR PCR transcriptase reversa

S sul

SSR Sequências simples repetidas

TE tampão de eluição

TPA terra preta arqueológica

U unidade de atividade amilolítica

UPGMA Unweighted pair group method with arithmetic mean

SUMÁRIO

1 INTRODU	JÇÃO	01
0.05.40.7.6		
	BIBLIOGRÁFICA	
2.1.		
2.2.		
	SÍNTESE DE AMIDO	
2.4.		
	α-AMILASES	16
2.6.	DIVERSIDADE GENÉTICA DE PLANTAS E ALIMENTOS POR	
	RAPD	
2.7.	EXPRESSÃO GÊNICA EM VEGETAIS	22
4 MATERIA	LE MÉTODOS	25
	AMOSTRAS	
4.2.	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES	29
	DIVERSIDADE GENÉTICA	
4	.2.1 Padronização da extração de DNA genômico	30
	.2.2 PCR-RAPD	
4	.2.3 Análise de agrupamento e matriz de similaridade genética	33
4.4.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	33
	.3.1 Obtenção do extrato enzimático	
4	.3.2 Determinação da atividade amilásica total	33
4.5.	EXPRESSÃO GÊNICA	34
4	.4.1 Padronização da extração de RNA total	34
4	.4.2 RT-PCR em tempo real	36

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 EXPERIMENTOS EXPLORATÓRIOS – EXTRAÇÃO DE DNA	38
5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA	40
5.3ATIVIDADE AMILOLÍTICA	63
5.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES	65
5.5EXPRESSÃO GÊNICA DA α-AMILASE	69
5.1 EXPERIMENTOS EXPLORATÓRIOS – EXTRAÇÃO DE DNA	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

Os produtos a base de raízes de mandioca são alimentos muito consumidos no Brasil, pois a planta é facilmente cultivada, economicamente acessível à maioria da população, e uma fonte rica em energia devido à alta concentração de carboidratos (BOOTH, 1996). De acordo com dados da FAO, o Brasil é um dos cinco maiores produtores mundiais de mandioca, ao lado da Nigéria, Thailândia, Indonésia, e República Democrática do Congo (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION, 2010a). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010), a produção brasileira de mandioca relativa à safra de 2009 foi de aproximadamente 26 milhões de toneladas, ocupando uma área de 1,8 milhões de hectares, destacando o país como um dos principais produtores mundiais.

No mercado interno, o produto mais popular da mandioca é a farinha, consumida sob várias formas. O amido ou fécula de mandioca, devido à suas caraterísticas reológicas, de alta viscosidade e gel transparente, bem como ao baixo teor de proteínas e à ausência de lipídeos, é muito usado na formulação de alimentos infantis e misturas semi-prontas, como agente geleificante e espessante. A farinha de mandioca tem sido usada também na formulação de alimentos destinados a pessoas que apresentam doença celíaca.

Sabe-se que após a colheita o período de armazenamento é muito curto, cerca de uma semana, devido à ação microbiana e de enzimas endógenas (HAGENIMANA et al., 1994). Nesse último caso, as enzimas α e β amilase podem estar relacionadas com este processo, através da liberação de carboidratos de baixo peso molecular, fornecendo energia para o desenvolvimento microbiano.

Para melhor utilização das raízes, com redução de perdas e aumento da produção de farinha, há grande necessidade de se compreender os mecanismos de deterioração das raízes de mandioca. Esse conhecimento possibilitaria desenvolver estratégias de controle da ação destas e de outras enzimas amilolíticas, através de estudos bioquímicos e moleculares, podendo gerar tecnologia, beneficiar pequenos e médios produtores, e melhorar a qualidade dos derivados obtidos industrialmente. Como exemplos, podem-se citar enzimas amilolíticas identificadas e caracterizadas

nas raízes, bem como os genes que as codificam (VEIGA, 2002; PASCUAL, 2005; TANGPHATSORNRUANG et al., 2005).

Paralelamente, diversas estratégias vêm sendo avaliadas objetivando sustentar a produção de mandioca. Estudos de melhoramento genético das raízes de mandioca permitem aumentar a resistência a pestes e doenças, associando controles efetivos de manejo e de ações biológicas. Em tempos de valorização do desenvolvimento sustentável e preservação de recursos naturais, tais achados científicos favorecem a produção agroindustrial de mandioca, através da obtenção de etanol a partir de resíduos como o farelo de mandioca, e seu emprego em reformadores que geram hidrogênio para células a combustível (OLIVEIRA et al., 2008).

Em complemento a essas pesquisas, a EMBRAPA está desenvolvendo um projeto na Região Norte para obtenção de novas variedades com características distintas das atuais variedades. Para avaliar o teor de açúcares, foram coletados cem cultivares de mandioca com características agronômicas pouco conhecidas, em comunidades indígenas na região Amazônica (Pará, Brasil). Diversas amostras entre estas variedades de mandioca apresentaram altos níveis de açúcares, o que permite sua utilização na obtenção de concentrados de glicose e frutose, amido seroso, amido solúvel, e produção de etanol, além de seu consumo direto como alimento. A presença de mono e oligossacárides pode ser indício de rota alternativa aos estudos voltados à compreensão dos processos de degradação do amido (EL-SHARKAWY, 2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MANDIOCA

A mandioca, *Manihot esculenta* (Figura 1), também conhecida como aipim e macaxeira, é uma planta que apresenta alta deposição e reserva de amido em suas raízes, com teores que variam de 20 a 40% em peso úmido, baixo teor protéico (menor que 1%) e pobre em vitaminas. A raiz de mandioca está presente na dieta de cerca de 600 milhões de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento. A produção mundial é de quase 233 milhões de toneladas/ano, com área cultivada de mais de 18 milhões de hectares (FAO, 2010b). Grande parte dessa produção é destinada à alimentação humana, através do consumo *in natura* e sob a forma de farinha. A raiz é utilizada também na alimentação animal, em indústrias de amido e de produtos químicos, bem como ingrediente, na forma de matéria-prima, em inúmeras formulações de alimentos industrializados (FAUQUET; TAYLOR, 2002).



Figura 1 – Uma das raízes de mandioca brava utilizadas neste estudo.

Mais de 70% do cultivo de mandioca é desenvolvido nas regiões tropicais e subtropicais, entre os paralelos 30°N e 30°S da África, América Latina e Ásia. As variedades de mandioca originárias da América do Sul foram domesticadas há mais de 5000 anos a partir da planta ancestral selvagem *M. esculenta ssp. Flabellifolia*. A seleção durante a domesticação permitiu grandes alterações fisiológicas e bioquímicas que distinguem a mandioca atual dos seus genitores. Além disso, encontra-se grande diversidade genética e morfológica entre variedades de mandioca, o que reflete seu potencial evolutivo (JANSSON et al., 2009).

As culturas de mandioca são consideradas chave nos sistemas itinerantes existentes no Brasil, por várias razões: 1) há consenso que a mandioca foi domesticada nas terras baixas e quentes das Américas; 2) a relação da cultura com os povos aqui existentes é muito antiga e a passagem do estado selvagem para o estado domesticado está permeada por uma ampla variedade de técnicas agrícolas; 3) existência de um grande número de variedades locais.

A mandioca é frequentemente cultivada em roças de agricultura autóctone por apresentar bom desenvolvimento em solos pobres, resistência a pragas e doenças e adaptação em diferentes regiões edafoclimáticas. A agricultura autóctone ou agricultura tradicional é um termo utilizado na literatura para designar o sistema agrícola cujas bases técnicas reportam ao Brasil pré-colonial, mantida pelas populações indígenas remanescentes e populações que assimilaram a técnica transmitida culturalmente por seus antepassados. Essas técnicas vão sendo adaptadas aos ecossistemas das regiões onde são praticadas (FARALDO et al., 2000).

A mandioca, ao longo do tempo, vem sendo propagada vegetativamente pela interferência humana, contudo manteve a reprodução sexuada ativa, promovendo a amplificação da variabilidade genética, o que permite selecionar genótipos de maior importância agronômica (SILVA et al., 2001). Isto favorece o surgimento de variabilidade em roças itinerantes, pois possibilita o cruzamento entre variedades diferentes, permite autofecundação e cruzamentos entre espécies do mesmo gênero. Nas condições de cultivo itinerante, isso faz com que os processos geradores de variabilidade estejam sob influência tanto de processos de seleção artificial como processos de seleção natural, fazendo com que a espécie esteja sob contínua dinâmica evolutiva (PERONI et al., 1999).

A planta pertence à família botânica Euphorbiaceae e possui um grande

número de espécies. Antigamente, a mandioca era a designação para duas espécies do gênero Manihot, sendo elas Manihot utilissima Phol e Manihot palmata, baseando-se na presença de altos ou baixos níveis de cianetos (brava e mansa), respectivamente. Recentemente, ambas as classes de mandioca brava e mansa classificadas sendo da mesma espécie Manihot esculenta como (BREUNINGER; PIYACHOMKWAN; SRIROTH, 2009). A planta é um arbusto perene, com raízes tuberosas de formato variado e em número de 5 a 10 tubérculos, podendo medir até 50 cm de comprimento. Cada raiz possui uma camada resistente de epiderme, rugosa, de cor marrom, seguindo-se uma camada cortical, facilmente descascável. A parte carnosa é descrita como branca ou ligeiramente amarelada, tendo no seu centro uma espécie de cordão fibroso (Figura 2). O caule é ereto, de cor cinza ou pardo-amarelada, e as folhas são simples, com 5 a 7 lóbulos, com flores unissexuadas masculinas, e fruto com 3 sementes tricoca (ADETAN; ADEKOYA; ALUKO, 2003; BRAGA, 1985).

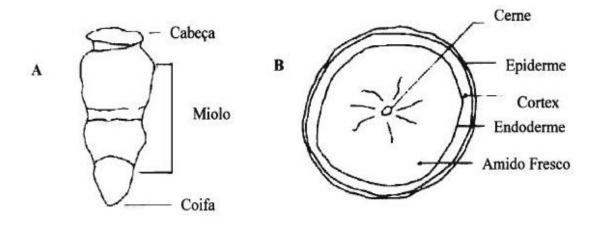


Figura 2 – Aspectos morfológicos da raiz de mandioca; A – morfologia geral; B – corte transversal.

Fonte: adaptada de ADETAN, ADEKOYA e ALUKO, 2003.

A raiz é composta basicamente por carboidratos, pobre em proteínas e lipídeos, e contém vitamina C, carotenóides, cálcio e potássio. A Tabela 1 revela as características de composição centesimal, minerais e vitaminas.

Tabela 1 – Composição nutricional de mandioca crua, por 100 gramas de parte comestível: centesimal, minerais e vitaminas.

	,	
	TBCAUSP ¹	TACO ²
Umidade (%)	62,98	61,8
Energia (kcal)	133	151
Proteína (g)	1,3	1,1
Lipídeos (g)	0,28	0,3
Carboidratos (g)	33,86	36,2
Fibra alimentar (g)	2,44	1,9
Cinzas (g)	1,58	0,6
Cálcio (mg)	-	15
Magnésio (mg)	-	44
Manganês (mg)	-	0,05
Fósforo (mg)	-	29
Ferro (mg)	-	0,3
Sódio (mg)		2
Potássio (mg)	-	208
Cobre (mg)	-	0,07
Zinco (mg)	-	0,2
Retinol (μg)	-	-
Tiamina (mg)	-	TR
Riboflavina (mg)	-	TR
Piridoxina (mg)	-	0,04
Niacina (mg)	-	*
Vitamina C (mg)	-	16,5

Legenda: TR: traços.

1 -Universidade de São Paulo, 2010; 2 -NEPA-UNICAMP, 2006;

Os cultivares de mandioca podem ser conservados no solo por anos, mas suas raízes são extremamente perecíveis, pois uma vez colhidas, devem ser processadas rapidamente para prevenir sua deterioração. Em diversas variedades a capacidade de armazenamento é observada entre 5 a 7 dias (PUONTI-KAERLAS, 1998). A deterioração da mandioca após a colheita é iniciada pela combinação de fatores fisiológicos, enzimáticos e oxidativos, seguidos por reações desencadeadas pelo crescimento microbiano (BUSCHMANN et al., 2000).

Pesquisadores da EMBRAPA identificaram recentemente variedades de

mandioca que apresentam altos teores de glicose, cerca de 10 vezes maior aos teores encontrados nas variedades comerciais, portanto sendo inadequadas para produção de farinha devido ao reduzido conteúdo de amido encontrado nas raízes, mas abririam a possibilidade de novos usos como alimento. As hipóteses aventadas para estas variedades são de que poderia ocorrer a inibição da expressão de algumas enzimas de síntese de amido, ou ainda a indução da expressão de enzimas envolvidas na degradação do amido, já que o tipo e a quantidade de amido de reserva nas raízes são determinados pelas especificidades nos processos de síntese e degradação. Assim, este material poderia ser usado como referência para desenvolver métodos focados na correlação da expressão de enzimas de degradação e teores de açúcares presentes.

2.2 COMPOSIÇÃO E UTILIZAÇÃO DO AMIDO

O amido é um polissacarídeo constituído por unidades de glicose interligadas entre si através de uma molécula de oxigênio (ligação glicosídica), conforme representado na Figura 3. É o principal material de reserva de plantas em sementes, tubérculos, raízes, bulbos e rizomas e a principal fonte de energia na nutrição animal. Na alimentação humana, o amido é considerado o macronutriente majoritário nas dietas das populações, sendo constituinte de uma grande variedade de produtos, e responsável pela textura e consistência dos alimentos industrializados e preparações culinárias. Entre as matérias-primas para sua extração destacam-se as raízes e tubérculos, como a mandioca e a batata, e os cereais como milho, trigo e arroz (FRANCO et al., 2002).

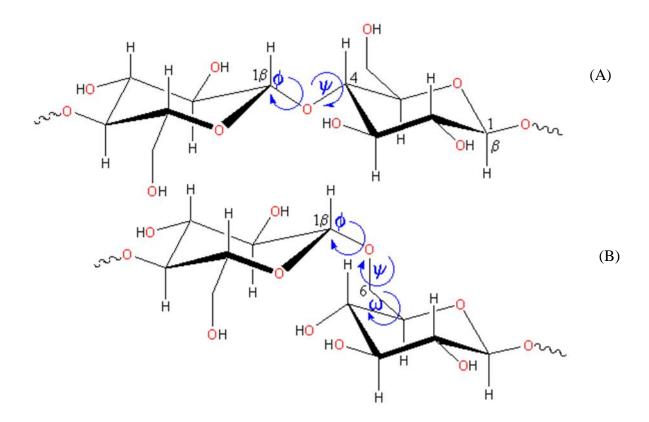


Figura 3 – Representação esquemática de monômeros de glicose unidos por ligação glicosídica α -1-4 (A) e por ligação α -1-6 (B).

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza, pela conversão de CO₂ e H₂O, através da fotossíntese, e a oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica fornecedora de energia para a maioria das células não fotossintéticas. As moléculas de amido são altamente hidratadas, pela presença de grupos hidroxila expostos, e pela capacidade de estabelecer ligações do tipo pontes de hidrogênio com a água.

Nos vegetais, o amido encontra-se em pequenos grânulos, de características peculiares a cada espécie, embora todos contenham estrutura e características semelhantes, como o hilo, que é o ponto de nucleação em torno do qual o grânulo se desenvolve (MYERS et al., 2000). Os grânulos de amido apresentam diâmetro variando de 0,1 a 50 µm, e são constituídos por duas frações distintas de polissacarídeos: amilose e amilopectina (BALL; MORREL, 2003).

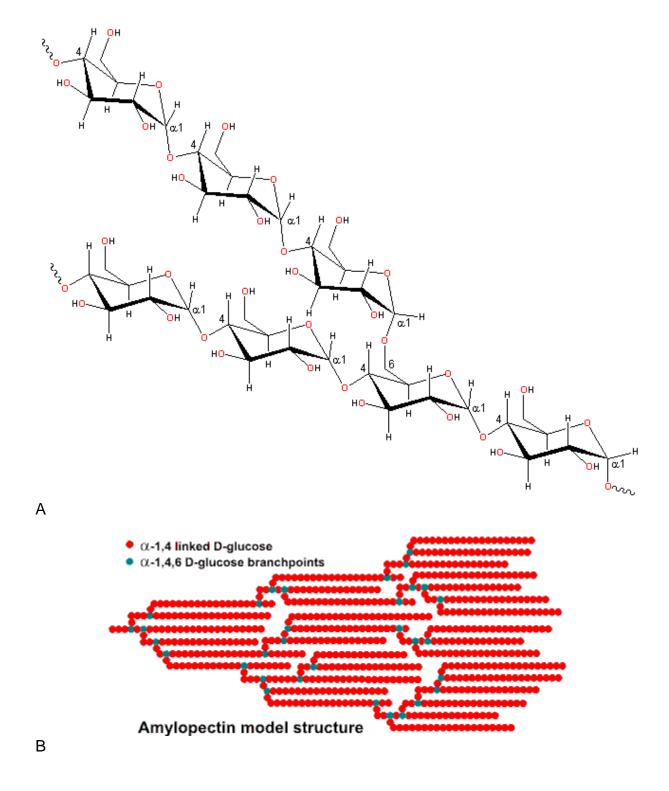


Figura 4 – Representação molecular (A) e estrutural (B) de amilopectina com ramificações a partir de ligações α-1-4.

A amilopectina é composta por uma longa cadeia ramificada, que apresenta aproximadamente a cada 30 ligações α -1,4 uma ligação α -1,6 (Figura 4). Seu peso molecular é da ordem de (50-500) x 10⁶ Da, e o comprimento das ramificações é variável, geralmente estando entre 20 a 30 unidades de glicose (SURMELY et al., 2002). Na amilose o monômero de glicose se repete cerca de 6000 vezes. Trata-se de um polissacarídeo linear constituído por resíduos de D-glicose unidos por ligações α -1,4 e possui um peso molecular que varia de 10⁵ a 10⁶ Da (Figura 5).

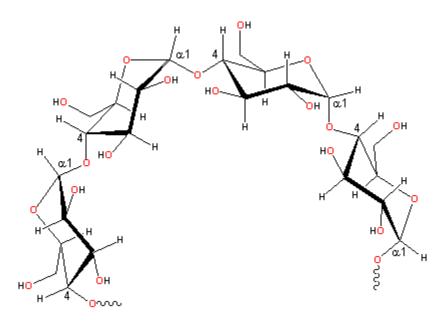


Figura 5 – Representação estrutural de fragmento da amilose

Tais macromoléculas contêm regiões cristalinas e amorfas em camadas alternadas, conferindo ao amido um caráter semicristalino, com regiões cristalinas e ordenadas onde se concentra a amilopectina. As ramificações agrupadas de amilopectina apresentam-se como duplas hélices empacotadas, formando lamelas cristalinas (Figura 6).

O armazenamento de amido sob a forma de grânulos é um processo conveniente para a planta, uma vez que é uma fonte insolúvel de energia, a qual pode ser gradualmente tornada aproveitável através da ação enzimática, sem aumentar a pressão osmótica. Os depósitos de amido podem ser transitórios ou permanentes. O transitório ocorre nas folhas onde ele é acumulado durante o dia, e é parcialmente desdobrado e transportado em forma de açúcares mais simples a outras partes da planta, durante a noite. Os depósitos permanentes ocorrem nos órgãos de reserva, como é o caso dos grãos de cereais e tubérculos, podendo

ocorrer também no caule e nas células imaturas próximas da zona de crescimento (FRANCO et al., 2002).

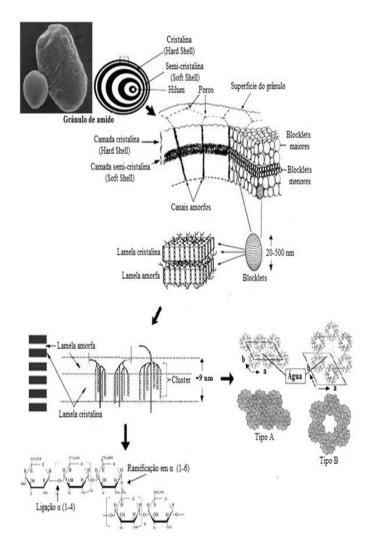


Figura 6 – Representação da estrutura do grânulo de amido e seus níveis de organização molecular interna amilose e amilopectina (GALLANT et al., 1997; BULEÓN, 1998).

O amido é passível de modificações químicas e bioquímicas, que permitem o melhoramento de suas propriedades funcionais, e ampliação de suas aplicações industriais. O amido e os amidos modificados apresentam numerosos empregos tais como adesivo, ligante, formador de películas, reforçador de espuma, agente gelificante e vitrificante, agente retentor de umidade, estabilizante, texturizante, e espessante (SMITH, A.; ZEEMAN; SMITH, C., 2005).

As diferenças na relação amilose-amilopectina, de fontes vegetais distintas, levam a distintas formas de estrutura granular, de propriedades físico-químicas e de

qualidade dos produtos finais (VAN HUNG; MAEDA; MORITA, 2006). Tais características são também influenciadas pela variabilidade da fonte vegetal e de suas condições de cultivo. Amidos chamados de serosos, ou waxy, contêm menos de 15 % de amilose, sendo que amidos normais apresentam entre 20 - 30% de amilose, enquanto os com mais do que 40 % são amidos de elevado conteúdo de amilose (TESTER; KARKALAS; QI, 2004; CORRADINI et al., 2005). Mutações influenciando a biossíntese do amido podem afetar drasticamente a quantidade de moléculas de amilose e amilopectina no grânulo de amido (WANG; BOGRACHEVA; HEDLEY, 1998). Assim, amidos de alguns genótipos mutantes de amidos de milho, cevada, arroz e trigo, contêm um elevado teor de amilose (com mais de 70 %) ou um elevado conteúdo de amilopectina (99-100 %) (VAN HUNG; MAEDA; MORITA, 2006). Recentemente e após longo trâmite em órgãos regulatórios, a União Europeia liberou o plantio de uma cultivar de batata geneticamente modificada, Amflora®, com alto conteúdo de amilopectina, destinada exclusivamente para fins industriais e de uso proibido em alimentos (EFSA, 2005. disponível em http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/323.pdf). A Tabela 2 exemplifica alguns desses tipos de amido destinados à industrialização, com suas características funcionais.

Tabela 2 – Propriedades gerais de alguns grânulos de amido

	Amido de milho comum	Amido de milho ceroso	Amido de batata	Amido de mandioca
Tamanho dos grânulos (eixo principal, µm)	2-30	2-30	5-100	4-35
Temperatura de gelatinização (°C)	62-80	63-72	58-65	52-65
Viscosidade relativa	Média	Média-alta	Muito alta	Alta
Clareza da pasta	Opaca	Levemente nebulosa	Clara	Clara
Tendência a gelificar/ retrogradar	Alta	Muito baixa	Média a baixa	Média
% de amilose	28	<2	21	17

Fonte: adaptado de BEMILLER e HUBER, 2010.

O emprego do amido em escala industrial se dá principalmente na área de Alimentos e Bebidas. Nestas indústrias o polissacarídeo é usado na produção de hidrolisados de glicose e espessantes em alimentos semi-sólidos. Os amidos podem ser hidrolisados por via química ou enzimática, permitindo sua posterior conversão em etanol, gás hidrogênio, frutose e sorbitol.

O amido da mandioca é muito usado industrialmente por possuir propriedade espessante de interesse a diversos segmentos, é extraído de forma mais pura, tem custo de extração baixo e possui maior capacidade de formação de géis claros, comparados a outras fontes de amido como milho e inhame (ALVES; GROSSMANN; SILVA, 1999).

2.3 SÍNTESE DE AMIDO

Diversas são as rotas bioquímicas e enzimas nos tecidos vegetais capazes de metabolizar o amido. Durante a síntese, há a participação de amido sintases, enzimas ramificadoras e desramificadoras em etapas subsequentes (MUKERJEA et al., 2002). A conversão do amido a açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose)

envolve várias enzimas em mais de uma via metabólica, representando um exemplo clássico de heterogeneidade da atividade enzimática que ocorre em bananas (AREAS; LAJOLO, 1981).

Na célula vegetal a maltose é convertida a hexose-fosfato, podendo ingressar na via glicolítica ou utilizada para a síntese de sacarose. O dissacarídeo é transportado a partir dos tecidos fotossintetizantes para tecidos consumidores, tais como folhas novas, raízes e frutos, os quais ressintetizam amido nos plastídeos. Este amido armazenado é muito importante para as plantas, e é degradado em sequência a variações sazonais ou estágios de desenvolvimento específicos, tais como o início da primavera e amadurecimento (BALL; MORREL, 2003).

Em plantas superiores, a biossíntese do amido envolve diversas enzimas, incluindo ADPglicose pirofosforilase, amido sintase, enzima ramificadora do amido, e enzima desramificadora do amido. A transferência de resíduos de D-glicose oriundos de unidades de difosfato de glicosilnucleotídeos (ADPglicose) à extremidade não redutora de uma molécula precursora (amilogenina) é catalizada pela amido sintase. Cinco subfamílias da amido sintase já foram identificadas em plantas superiores: amido sintase ligada ao grânulo (GBSS), e quatro isoformas solúveis – SSI, SSII, SSIII e SSIV – (JAMES et al., 2003; BALL; MORREL, 2003; MYERS et al., 2000).

2.4 ENZIMAS AMILOLÍTICAS EM PLANTAS

Amilases são carboidrases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 presentes no amido, no glicogênio e nos sacarídeos derivados. Existe uma variedade de enzimas que correspondem a essa definição e que podem ser agrupadas de acordo com diferentes características: modo de ação (endo- ou exo-), retenção ou inversão de configuração (alfa ou beta), afinidade por ligações do tipo α -1,4, ou do tipo α -1,6, atividade de transglicosilação ou não (Figura 7). As enzimas de maior importância para a indústria de alimentos são as α -amilases, β -amilases, glicoamilases e algumas enzimas desramificantes (YAMAMOTO, 1994).

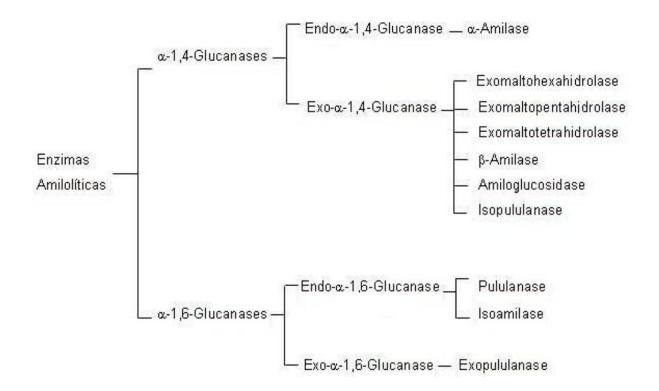


Figura 7 – Classificação das enzimas amilolíticas Fonte: adaptado de NIGAM e SINGH, 1995.

As amilases são classificadas em: α -amilases, que hidrolisam ligações no interior do substrato (endoamilases), β -amilases, as quais hidrolisam a penúltima ligação α -1,4, da extremidade não redutora da cadeia do substrato (exoamilases), e as glicoamilases, que hidrolisam ligações glicosídicas dos tipos α -1,4, e/ou α -1,6, de oligossacarídeos (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LÓPES, 1995).

Além da α -amilase e da glicoamilase, utilizadas na hidrólise principal do amido à glicose, outros tipos de amilases microbianas, como a pululanase, a isoamilase e a ciclodextrina-glicosiltransferase, são empregadas industrialmente na hidrólise seletiva do polissacarídeo, sendo obtidos produtos com características específicas e alguns com alto valor agregado, como as ciclodextrinas, insumos importantes na fabricação de alimentos, fármacos, cosméticos, e materiais termoplásticos biodegradáveis. O uso dessas enzimas possibilitou um avanço considerável na indústria do amido, em substituição à hidrólise ácida (ANTRIM et al., 1989).

O amido pode ser degradado por atuação de enzimas amilolíticas. A atividade amilásica de raízes de mandioca no período pós-colheita mostra um gradual aumento em função do tempo de armazenamento (AFOAKWA; SEFADEDEH, 2002;

PADMAJA; BALAGOPAL, 1985). A perda inicial de qualidade é efeito da deterioração fisiológica, caracterizada por coloração azulada escura dos feixes vasculares das raízes, que geralmente iniciam-se nas superfícies cortadas e progridem ao longo do comprimento da raiz (WENHAM, 1995).

Os setores da indústria que utilizam o amido como matéria prima estão à procura de amidos nativos com propriedades específicas, principalmente resistência a tratamentos industriais estressantes que alteram a estrutura do gel do amido: temperaturas altas, que conduzem a processos de hidratação, formação de gel, hidrólise e diminuição da viscosidade; baixas temperaturas, em alimentos refrigerados e em condições de armazenamento, com perda de água por sinerese; condições de alta acidez, desestruturação do gel do amido e hidrólise parcial; fortes tensões, no cisalhamento mecânico, na compressão de comprimidos, na homogeneização, entre outras.

Diversas dúvidas ainda permanecem sem esclarecimento sobre o papel das enzimas amilolíticas no metabolismo do amido da mandioca. Algumas enzimas envolvidas nos processos de síntese e degradação do amido ainda necessitam ser mais bem estudadas. Resultados obtidos em nosso laboratório por Matos da Veiga (2002) demonstraram que a variedade Zolhudinha, de origem amazônica apresentou comportamento diferenciado das raízes comerciais, com alta atividade amilolítica.

2.5 α-AMILASES

Enzimas hidrolíticas desempenham um papel central no processo de degradação do amido. As α -amilases (EC 3.2.1.1 1,4- α -D-glucano glucanohidrolase) são enzimas responsáveis pela mobilização de carboidratos por catalisar clivagens endoglicolíticas ao acaso das ligações α -1,4 entre os resíduos de glicose das cadeias de amilose e amilopectina que compõem as reservas de amido (Figura 8). Como produtos da reação são obtidos maltose, maltotriose e α -dextrina. Mesmo quando outras enzimas amilolíticas participam do processo de degradação de amido, a contribuição da α -amilase é pré-requisito para o início do processo (TANGPHATSORNRUANG et al, 2005). Além das enzimas de origem endógena, as α -amilases estão presentes em uma grande variedade de microrganismos, plantas e animais (NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2003). Em microrganismos exercem papel

indispensável para a sobrevivência da espécie com a expressão de enzimas liberadas no meio de crescimento, comparativamente mais ativas do que as de origem vegetal ou animal.

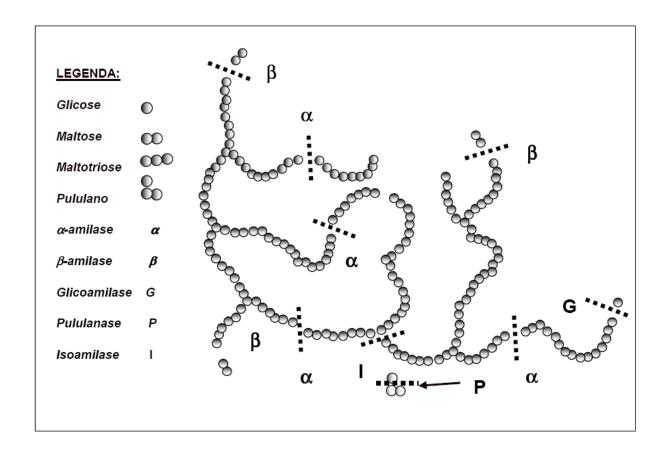


Figura 8 – Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas α -amilase, β -amilase, glicoamilase, isoamilase e pululanase, e de seus produtos de hidrólise.

Inicialmente, a ação dessas enzimas sobre o amido é rápida, com maior atividade sobre substratos de alto peso molecular, gerando uma mistura de oligossacarídeos. Essa ação é considerada inicial no processo de mobilização das reservas de amido. Em longos tempos de reação, α–amilases microbianas, sobretudo de *Bacillus liquefasciens*, são capazes de produzir glicose a partir de amilose (DEMIRKAN et al., 2005).

As α-amilases são estabilizadas na presença de íons de cálcio, o que reduz a desnaturação. Além de ter um raio iônico de 0,99 Å, o íon cálcio é capaz de formar ligações de coordenação com até 12 átomos de oxigênio. A combinação dessas

duas características torna o cálcio um elemento quase exclusivo entre todos os cátions em sua capacidade de se encaixar ordenadamente dentro da cadeia peptídica, promovendo o enrijecimento da molécula de proteína e fixando sua estrutura terciária (SHILLS, 1999).

Para a atividade da α-amilase também é necessária a presença de íon Ca²⁺ como cofator, pois na sua ausência a enzima perde a capacidade hidrolítica. O cálcio não influi somente na atividade da enzima como também aumenta sua estabilidade frente a trocas de temperatura e de pH. O íon não participa diretamente na formação do complexo enzima-substrato, mas mantém a molécula da enzima na conformação ótima para a máxima atividade e estabilidade. Os traços de cálcio presentes no amido são suficientes para saturar com este íon a enzima privada dele. De todas as formas a adição de Ca²⁺ é útil para assegurar uma estabilidade máxima da enzima frente à desnaturação pelo calor.

Em trabalhos anteriores, uma característica comum em 10 variedades de mandiocas analisadas foi a detecção de α -amilase termorresistente nas raízes (PASCUAL, 2005; VEIGA, 2002). Entre as amostras, a variedade Zolhudinha, mandioca brava também de origem amazônica, destacou-se das demais pela alta atividade amilásica. Nessa variedade foram realizados ensaios de caracterização bioquímica da α -amilase com alta atividade *in vitro*, mas não foi possível relacionar a atividade enzimática nas raízes com o estado de conservação do produto póscolheita (resultados não publicados).

2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA DE PLANTAS E ALIMENTOS POR RAPD

Os polimorfismos constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas, nos quais sua presença ou ausência pode caracterizar um organismo cuja sequência, na maioria das vezes, é desconhecida. Marcadores moleculares têm sido usados na detecção de variabilidade genética ou polimorfismo em organismos. As principais técnicas que são utilizadas na análise genética de plantas são: investigação de sistemas enzimáticos, RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), SSR (Sequências simples repetidas), AFLP (Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA), entre outras. De maneira geral, as técnicas de marcadores

moleculares estão sendo utilizadas na caracterização e discriminação genotípica bem como na identificação de marcadores ligados às características desejáveis em vegetais. Também possibilitam marcar características de efeito poligênico (ARAÚJO et al., 2003).

Técnicas mais recentes como a de microarranjos (*microarrays*) de ácidos nucléicos e de proteínas têm sido empregadas com diminutas quantidades de material e alta eficiência. Os microarrays vêm sendo usados em estudos de transcriptômica e metabolômica (SAITO; HIRAI; YONEKURA-SAKAKIBARA, 2008). As aplicações são inúmeras, sobretudo em casos de polimorfismos e evolução de espécies (GUPTA; RUSTGI; MIR, 2008), investigações sobre processos degenerativos e patológicos em animais e humanos, caracterização de cepas de microrganismos, etc. No entanto trata-se de uma metodologia ainda muito cara e trabalhosa para emprego rotineiro.

A introdução de marcadores moleculares em estudos biológicos oferece novas oportunidades de investigação para diversidade genética, e permite determinar relações genéticas entre variedades e espécies (GOSTIMSKY; KOKAEVA; KONOVALOV, 2005), incluindo estudos na área de Ciência dos Alimentos (PASCOAL et al., 2008). Estas perspectivas têm promovido grande interesse na aplicação em marcadores de DNA (GIMÉNEZ et al., 2009).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), um dos aspectos fundamentais da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de amplificar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos para DNA (ex: brometo de etídio). Entretanto, a técnica de PCR ainda apresentava uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares distribuídos pelo genoma, com exceção de alguns genes de sequência conhecida. A construção de iniciadores para a amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento prévio dos oligonucleotídeos que correspondem à sequência de DNA de interesse. Para essa identificação era necessária a clonagem e sequenciamento da região.

O grande avanço no estudo molecular baseado em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar iniciadores mais curtos e de construção arbitrária para direcionar a reação de amplificação, não se fazendo necessário o conhecimento prévio do oligonucleotídeo. Esta técnica foi desenvolvida nos Estados Unidos por

Williams et al. (1990) que patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA), DNA polimórfico amplificado ao acaso, utilizando uma análise mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento. A técnica de RAPD é uma variação da PCR que gera fragmentos de DNA polimórficos, característicos para um determinado organismo. Esta técnica utiliza somente um oligonucleotídeo com 10 bases em vez de um par de iniciadores, e sua sequência é construída ao acaso, o qual gera a amplificação de várias sequências desconhecidas. Assim, assume-se que diferentes indivíduos produzem distintos padrões de fragmentos amplificados com base nas diferentes localizações dos sítios de hibridização dos iniciadores ao longo da fita de DNA.

A técnica de RAPD baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de iniciadores, como pequenos oligonucleotídeos complementares, que se hibridizam ao DNA e, por sua vez, servem como moldes na amplificação através de PCR. Nesta técnica, utiliza-se apenas um único oligonucleotídeo que apresenta sequência randômica com predomínio de bases citosina e guanina (C/G 60 a 80%), e, portanto, com alvo desconhecido (WONG et al., 1997). Alguns trabalhos na literatura relatam investigações de diversidade genética em vegetais destinados à alimentação humana, tais como arroz (ARAÚJO et al., 2003), e mandioca (MÜHLEN et al., 2000; WONG; YEOH; LIM et al., 1999; BEECHING et al., 1993).

Na Figura 9 está representado o iniciador 2 que se intercala na fita de DNA (com temperaturas de hidridização mais baixas do que as comumente empregadas em PCR convencional), produzindo a síntese do produto B. O mesmo procedimento é realizado da mesma forma para produzir os produtos A e C. Trata-se, portanto, de uma técnica simples que requer pequenas quantidades de DNA, não necessitando o conhecimento prévio da sequência de DNA dos organismos a serem estudados, podendo ser aplicada a qualquer espécie e tem sido utilizada para detecção de polimorfismo em uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, protozoários, plantas e animais (HUNT; JUNIOR, 1992).

O polimorfismo entre os produtos de amplificação é detectado com frequência e o nível de regiões polimórficas é geralmente elevado. O polimorfismo produzido pela técnica de RAPD aparece sob a forma de presença ou ausência de fragmentos ou bandas no gel. São úteis como marcadores genéticos e podem ser detectados através do exame de um gel de agarose revelado com brometo de etídio (WILLIAMS

et al., 1990, 1993; SILVEIRA et al., 2000).

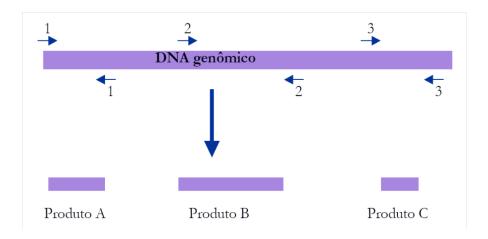


Figura 9 – Diagrama da reação de polimorfismos de DNA por amplificação ao acaso (PINHATI, 2008).

Um alto grau de padronização e controle interno é extremamente importante para obter perfis reprodutíveis de DNA na aplicação desta técnica. Há muitos parâmetros nos quais pequenas mudanças alteram os perfis de fragmentos amplificados. Apesar do conceito da técnica ser simples, esses parâmetros devem estar dentro de limites adequados para sua reprodutibilidade, isto é, concentrações compatíveis de DNA, iniciador e enzima, assim como o número de ciclos (SILVEIRA et al., 2000; ZHOU et al., 2004).

Diferentemente de outros métodos, a técnica de RAPD não necessita de trabalhos preliminares, como a construção de bancos genômicos, pois não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse, eliminando a necessidade de transferência de DNA para membranas (*Southern Blot*) e a utilização isótopos radioativos (WELSH; MCLELLAND, 1990).

Estima-se em cerca de 7000 o número de variedades de mandioca encontradas em todo o mundo, em sua maioria etnovariedades ("folk varieties"), mantidas por agricultores tradicionais. Estudos mais detalhados, em função de características morfológicas, caracteres agronômicos e bioquímicos, isoenzimas e marcadores de DNA, quantificaram e mostraram alguns aspectos da distribuição da

variabilidade genética da cultura. Um aspecto interessante sobre a organização do germoplasma da mandioca é que, apesar de não haver caracteres morfológicos especificamente associados à distinção entre mandioca brava e mandioca de mesa, conjuntos de marcadores de DNA podem estabelecer essa distinção entre os dois grupos. A similaridade genética obtida por análise de marcadores de DNA vem sendo usada para estimar a diversidade genética em coleções de germoplasma (MÜHLEN et al., 2000).

Devido à rapidez e à eficiência das análises por RAPD, mapas genéticos foram desenvolvidos para diversas espécies de plantas em curto período (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). Nos últimos 10 anos, a análise de diversidade genética por RAPD foi aplicada em arroz (ARAUJO et al., 2003), oliva (BUSCONI et al., 2003), batata doce (LIN et al., 2009), açafrão (RUBIO-MORAGA et al., 2009).

2.7 EXPRESSÃO GÊNICA EM VEGETAIS

O estudo dos padrões de expressão gênica é um dos pilares da biologia molecular moderna. Análises de expressão gênica têm fornecido informações sobre processos biológicos complexos, ampliando a compreensão acerca das vias metabólicas (JAIN et al, 2006). Muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando a técnica da transcrição reversa acoplada com a reação de polimerase em cadeia, comumente chamada de RT-PCR. Atualmente, é considerado o método padrão para o estudo de expressão de genes selecionados, sendo suas principais vantagens maior sensibilidade e especificidade, e ampla extensão dinâmica de detecção (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008).

A quantificação por RT-PCR em tempo real, baseada da detecção de fluorescência associada à formação de fragmentos amplificados, apresenta alta sensibilidade na análise de pequenas quantidades de ácidos nucléicos (até 3 cópias de alvo) em amostras provenientes de vários organismos, e aplica-se nas áreas de diagnóstico molecular, ciências da vida, agricultura e medicina. Além do uso como ferramenta de pesquisa, muitas aplicações de diagnóstico têm sido desenvolvidas, incluindo a quantificação de microrganismos, identificação de organismos geneticamente modificados, avaliação do risco para recorrência de câncer, e

investigação forense (BUSTIN et al, 2009).

Estudos de caracterização e expressão de α -amilase têm sido conduzidos em cevada (FINCHER, 1989), trigo (FINCHER, 1989; VRINTEN; NAKAMURA, 2000), milho (DANTAS et al., 2002) e arroz (FINCHER, 1989; KANEKO et al., 2002), mostrando a necessidade de novas investigações sobre os processos de transcrição, tradução e ativação dessa enzima em raízes de mandioca (TANGPHATSORNRUANG et al., 2005).

A utilização de técnicas de identificação de mRNA, e posterior análise da expressão gênica, pode definir a cinética de produção de α-amilase, bem como o estabelecimento de correlações entre a influência de fatores abióticos (umidade, temperatura) na atividade dessa enzima e, o perfil de carboidratos presente em diferentes variedades de mandioca existentes.

A síntese da α -amilase é acompanhada por aumento na síntese de mRNA correspondente, com regulação transcricional mediada por fito-hormônios, sinais metabólicos e estresse hídrico. Estudos relacionando o papel da α -amilase e seus padrões de expressão gênica são muito limitados. Em batata, o papel da α -amilase na degradação de amido é controverso, e informações adicionais sobre os mecanismos bioquímicos são necessárias. Os níveis de mRNA de α -amilase e atividade amilásica em feijão aumentam nos primeiros dias de germinação, o que é consistente com o papel atribuído à enzima de ser a responsável pelo ataque inicial aos grânulos de amido. Em mutantes de *Arabidopsis thaliana*, apresentando três genes de α -amilase silenciados, foi observada taxa normal de degradação de amido, indicando que a enzima, ao menos nesta planta, não é essencial, ou que a pode conter uma nova proteína com atividade endoamilásica (TANGPHATSORNRUANG et al., 2005).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- Avaliar a variabilidade genética das variedades de mandioca estudadas, através de marcadores moleculares;
- Investigar o padrão de expressão do gene amy2 em raízes das variedades de mandioca estudadas, avaliando possível correlação entre nível de expressão gênica e atividade enzimática;
- Avaliar a atividade da α -amilase presente nas variedades de mandioca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As amostras de mandioca avaliadas neste estudo são provenientes das comunidades indígenas Juruti e Caxiuanã, no estado do Pará (Figura 10). Juruti é um município localizado a 848km da capital Belém, PA, e sua população estimada é de 35 mil habitantes em 2009. A comunidade indígena Caxiuanã é uma unidade de conservação federal do Brasil, e está localizada nos municípios de Portel e Melgaço, a 300km de Belém, PA. Esta comunidade abriga a Estação Científica Ferreira Penna, administrada pelo Museu Paraense Emílio Goeldi.



Figura 10 – Mapa de localização das reservas indígenas Juruti (A) e Caxiuanã (B).

Estas localidades apresentam como característica agronômica relevante a presença do solo de terra preta arqueológica (TPA), também conhecida com terra preta de índio. As áreas com TPA são encontradas sobre os mais diversos tipos de solos e normalmente se localizam em terra firme, próximas às margens de rios, em locais bem drenados. A TPA pode ser identificada por sua cor escura, resultado da concentração de substâncias orgânicas depositadas no solo que apresentam altos teores de cálcio, carbono, magnésio, manganês, fósforo e zinco, elementos que tornam a terra fértil (Figura 11), desmitificando que os solos da região são pobres e impróprios para a agricultura (COSTA et al., 2004).



Figura 11 – Aspecto da Terra Preta Arqueológica na região Amazônica

Torna-se necessário esclarecer que a classificação das amostras empregadas neste trabalho foi arbitrária visto que não houvera, nas épocas de colheita e de replantio, uma denominação de acesso às variedades. No entanto, as identificações originais encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Identificação das amostras coletadas

Identificação /coleta Primeira Segunda Este trabalho Morador 1		D	0 /	-
Morototó			Segunda	Este trabalno
Açaí-Tauá 3		•	_	_
Tucunaré			_	_
Manicuera 5			_	_
Macaxeirão 6			_	_
Açaí-Açú 7 -<			_	_
Taná 8			_	_
Domingo Tauá mar	, ,		_	_
Morototó amarela 10			_	_
Achada LP		_	_	_
Helena Branca mar 12			_	_
Sururi 13			_	_
Ouro 14	Helena Branca mar		_	_
Chabé Mar 15	Sururi	_	_	_
Chabé Rai 16	Ouro	14	_	_
Bacuri Caiana Mar	Chabé Mar	15	_	_
Bacuri caiana Rai	Chabé Rai	16	_	_
Jabuti Mar 19	Bacuri Caiana Mar	17	_	_
Jabuti Rai 20	Bacuri caiana Rai	18	_	_
Arara Amarela mar 21	Jabuti Mar	19	_	_
Arara amarela Rai 22	Jabuti Rai	20	_	_
Pai Lorenço Mar 23	Arara Amarela mar	21	_	_
Pai Lorenço Rai 24	Arara amarela Rai	22	_	_
Macaxeira Mar 25 _ _ Macaxeira rai 26 _ _ tartauruga rai 27 _ _ Misteriosa mar 28 _ _ Misteriosa Rai 29 _ _ Açai'-Tingá mar 30 _ _ Açai'-Tingá Rai 31 _ _ Zolhuda 32 _ _ Casca de vidro 33 _ _ Peixe boi 34 _ _ Arumã 35 _ _ Arumã 36 _ _ Arumã B 38 _ _ Carra Azeda 39 _ _ Branquinha 40 _ _ Perereca LP LP1 1 1 Milagrosa LP LP2 2 2 Coaraci LP LP3 3 3 Brebi LP4 4 4 Pororoca LP LP5 5 5 Achada mar LP6 6	Pai Lorenço Mar	23	_	_
Macaxeira rai 26	Pai Lorenço Rai	24	_	_
tartauruga rai 27	Macaxeira Mar	25	_	_
Misteriosa mar 28	Macaxeira rai	26	_	_
Misteriosa Rai 29	tartauruga rai	27	_	_
Açai'-Tingá mar 30	Misteriosa mar	28	_	_
Açai'-Tingá Rai 31	Misteriosa Rai	29	_	_
Zolhuda 32	Açai'-Tingá mar	30	_	_
Casca de vidro 33	Açai'-Tingá Rai	31	_	_
Peixe boi 34	Zolhuda	32	_	_
Arumã 35	Casca de vidro	33	_	_
Amarelinha 36	Peixe boi	34	_	_
Tartaruga 37	Arumã	35	_	_
Arumã B 38	Amarelinha	36	_	_
Carra Azeda 39	Tartaruga	37	_	_
Branquinha 40		38	_	_
Perereca LP LP 1 1 1 Milagrosa LP LP 2 2 2 Coaraci LP LP 3 3 3 Brebi LP 4 4 4 Pororoca LP LP 5 5 5 Achada mar LP 6 6 6 Coaraci Amarela LP LP 7 7 7 S. Lorival LP 8 8 8 Amarelinha AT AT 1 9 9 Manicuera branca AT AT 2 10 10 Macaxeira AT AT 3 11 11		39	_	_
Milagrosa LP LP 2 2 2 Coaraci LP LP 3 3 3 Brebi LP 4 4 4 Pororoca LP LP 5 5 5 Achada mar LP 6 6 6 Coaraci Amarela LP LP 7 7 7 S. Lorival LP 8 8 8 Amarelinha AT AT 1 9 9 Manicuera branca AT AT 2 10 10 Macaxeira AT AT 3 11 11		40	_	_
Coaraci LP LP 3 3 3 Brebi LP 4 4 4 Pororoca LP LP 5 5 5 Achada mar LP 6 6 6 Coaraci Amarela LP LP 7 7 7 S. Lorival LP 8 8 8 Amarelinha AT AT 1 9 9 Manicuera branca AT AT 2 10 10 Macaxeira AT AT 3 11 11	Perereca LP	LP 1	1	
Brebi LP 4 4 4 Pororoca LP LP 5 5 5 Achada mar LP 6 6 6 Coaraci Amarela LP LP 7 7 7 S. Lorival LP 8 8 8 Amarelinha AT AT 1 9 9 Manicuera branca AT AT 2 10 10 Macaxeira AT AT 3 11 11	Milagrosa LP	LP 2		
Pororoca LP LP 5 5 5 Achada mar LP 6 6 6 Coaraci Amarela LP LP 7 7 7 S. Lorival LP 8 8 8 Amarelinha AT AT 1 9 9 Manicuera branca AT AT 2 10 10 Macaxeira AT AT 3 11 11	Coaraci LP	LP 3		
Achada mar LP 6 6 6 Coaraci Amarela LP LP 7 7 7 S. Lorival LP 8 8 8 Amarelinha AT AT 1 9 9 Manicuera branca AT AT 2 10 10 Macaxeira AT AT 3 11 11				
Coaraci Amarela LPLP 777S. LorivalLP 888Amarelinha ATAT 199Manicuera branca ATAT 21010Macaxeira ATAT 31111				
S. Lorival LP 8 8 8 Amarelinha AT AT 1 9 9 Manicuera branca AT AT 2 10 10 Macaxeira AT AT 3 11 11				
Amarelinha ATAT 199Manicuera branca ATAT 21010Macaxeira ATAT 31111			7	
Manicuera branca ATAT 21010Macaxeira ATAT 31111				
Macaxeira AT AT 3 11 11	Amarelinha AT		9	
			10	10
Gunguinha AT AT 4 12 12				
	Gunguinha AT	AT 4	12	12

Tabela 3 – Identificação as amostras coletadas (continução)

	D : .	0 /	_ , , , , ,
Identificação /coleta	Primeira	Segunda	Este trabalho
Chabé	M14	13	13
Tucunaré	M15	18	14
Bacuri Caiana	M16	14	15
Morototó amarela	M17	19	16
Jabuti	M18	20	17
Macaxeira amarela	M19	21	18
Açaí-Tingá	M20	22	19
Murutá-Tingá	M21	15	20
Achada	M22	23	21
Arara amarela	M23	16	22
Açaí-Tauá	M24	24	23
Ouro	M25	_	
Misteriosa	M26		
Domingo Tauá	M27	35	24
Manicuera	M28	_	
Macaxeira branca	M29	_	
Pretinha	M30	33	25
Sururi	M31	_	
Açaí-açú	M32	 .	
Jaçanã	M33	34	26
Pindobá	N34	_	
Pepoí	N35	_	
Casca de vidro	N36	_	
Amarela Naza	N37	_	
Peixe-boi	R1	40	27
Tartaruga	R10	46	28
Macaxeira	R11	_	
Arara amarela	R12	_	
Pretinha	R13	π.	
Jabuti	R2	41	29
Açaí-Tingá	R3	_	
Bacuri Caiana	R4	_	
Chabé	R5	_	
Amarelinha	R6	_	
Tauá	R7	_	
Morototó	R8	_ _	
Manicuera	R9	47	30

Em expedição realizada por pesquisadores da EMBRAPA, cem variedades foram coletadas e transferidas para as a estação experimental da Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica, RJ, onde foram replantadas e mantidas. Da estação experimental foram coletadas amostras de folhas e raízes referentes a 30 acessos de mandioca que apresentavam viabilidade, determinada pelo estágio de desenvolvimento, e foram transportadas sob temperatura de 4°C, conforme esquematizado (Figura 12). Na planta-piloto de Fisiologia Pós-Colheita, da Embrapa Agroindústria de Alimentos, as amostras foram lavadas, descascadas, e fracionadas, para conservação em freezer –18°C, até o momento das análises.

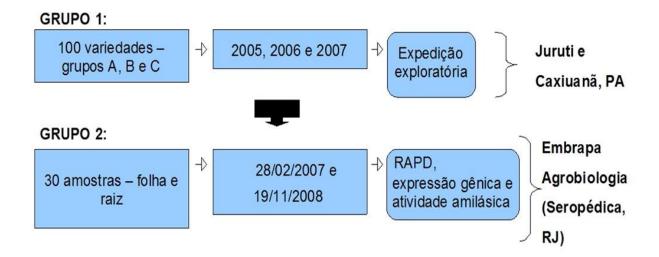


Figura 12 – Fluxograma da coleta de amostras

4.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

A dosagem dos teores de açúcares foi realizada por separação cromatográfica das amostras em coluna de Fase Reversa e consequente determinação da concentração dos açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (MACRAE, 1998).

As amostras de raízes de mandioca, preparadas em duplicata, foram trituradas em moinho de facas a fim de aumentar a superfície de contato, e em seguida homogeneizadas. Uma alíquota de 1 g foi pesada e solubilizada em 15 mL de água e acetonitrila 2:1. O material foi submetido à filtração, com posterior centrifugação a 14.000 rpm/10 min.

Alíquotas de 20 µL foram injetadas em coluna Amino 30cm x 4,6 mm (High Performance Carbohydrate) a temperatura ambiente, com acetonitrila a 75% como fase móvel. A detecção foi realizada a 45°C em detector IR2410. Os solventes de eluição foram acetonitrila (A) e água Milli-Q (B), a 75 e 25% respectivamente. A quantificação se deu através de curvas de calibração a partir de soluções padrão.

4.3 DIVERSIDADE GENÉTICA

4.2.1 Padronização da extração de DNA genômico

Para o isolamento de DNA genômico, as folhas de mandioca foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, a fim de facilitar o processo de lise celular. Foram testadas duas metodologias de extração de DNA genômico: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), no qual foi empregada uma coluna com resina de silica ligante de DNA, e o protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983), com modificações, no qual o DNA foi isolado na presença de SDS. As etapas que constitutem os protocolos estão descritas no anexo 1.

Análise da amplificação dos isolados de DNA

Os extratos de DNA foram avaliados quanto ao perfil eletroforético, e quanto à capacidade de amplificação do DNA isolado, através de PCR qualitativa. Os oligonucleotideos liofilizados e dessalinizados foram sintetizados pela Invitrogen do Brasil. São eles: Endo 1/Endo 2 (TANGPHATSORNRUANG et al., 2005), correspondentes aos gene da actina. A PCR foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (PerkinElmer), conforme descrito a seguir:

- 45 μL de PCR Supermix (Invitrogen, São Paulo, Brasil) 22 nM Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM Kcl, 1,65 mM MgCl2, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP, 1 U de Taq DNA polimerase;
- 400 nM de cada oligonucleotídeo;
- 100 ng de DNA molde;

A amplificação foi realizada em tubos de 0,2 ml usando um volume total de 50 μ L. As condições de ciclagem térmica utilizadas na reação estão descritas na Figura 13.

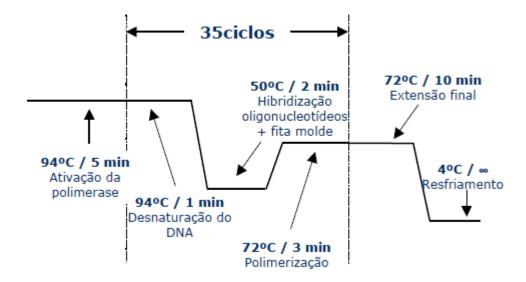


Figura 13 – Representação esquemática da PCR utilizada na avaliação capacidade de amplificação do DNA isolado a partir de folhas de mandioca.

Os produtos da PCR foram fracionados em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA, contendo brometo de etídeo (Invitrogen) a 0,5 µg/mL, em cuba de eletroforese Sub-Cell Model 192 (BioRad). Padrões de massa molecular foram empregados na eletroforese a fim de permitir a identificação dos fragmentos gerados (Low mass DNA ladder e 10 0bp DNA ladder, Invitrogen). As amostras foram submetidas a eletroforese a 180 V, 220 mA, por 90 min, através de fonte Power NPAC 300 (BioRad) (SAMBROOK; RUSELL, 2001).

Após a corrida, o gel foi fotodocumentado em transiluminador sob luz UV (λ = 302 nm), modelo ECX-20M, acoplado a sistema de documentação digital (Vilber Lourmat Biosystems).

4.2.2 PCR-RAPD

Para as análises de diversidade genética, nove amostras foram inicialmente selecionadas, em função de informações preliminares sobre o conteúdo de açúcar em suas raízes, sendo elas: A1, A2, B1, B2, B3, C1, C2, C3 e C4. O período de coleta está descrito na Tabela 4. O extrato de DNA obtido a partir das variedades de

mandioca estudadas (folha) foi empregado na amplificação. A análise dos polimorfismos foi conduzida utilizando 20 iniciadores do conjunto OPERON W (Operon Technologies, Alabama, Estados Unidos). A reação de RAPD foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 2400 (PerkinElmer). O meio reacional (volume final de 50µL) foi constituído por: 50 ng de DNA, tampão de PCR 1x (20 mM Tris-HCl pH 8.4; 50 mM KCl), 3.5mM MgCl₂, 400 µM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, California, Estados Unidos), 0.15 U/µL Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen Life Technologies) e 0.2 µM de oligonucleotídeo (OPW01 -OPW20). O perfil de ciclagem térmica incluiu uma desnaturação inicial (94°C por 1 min), 45 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 seg, hibridização dos oligonucleotídeos a 37°C por 30 seg, e alongamento a 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 5 min. Após os ciclos, uma alíquota de 10 µl, contendo os produtos da reação, foi analisada por eletroforese, conforme descrito anteriormente. A aplicação das alíquotas de PCR-RAPD seguiu a mesma ordem em todos os 20 géis: A1; C2; B3; A2; C3; B2; C1; B1; C4. Após a seleção do oligonucleotídeo que permitiu a análise de diversidade genética, as 30 amostras foram analisadas sob as mesmas condições experimentais acima descritas.

Tabela 4 – Período de coleta das nove amostras inicialmente avaliadas quanto à diversidade genética (Juruti e Caxiuanã, PA, Brasil).

Ano de coleta	Amostras	
2005	A1; A2	
2006	B1; B2; B3	
2007	C1; C2; C3; C4	

4.2.3 Análise de agrupamento e matriz de similaridade genética

Os marcadores RAPD gerados foram agrupados por média através do coeficiente de Pearson, também conhecido como coeficiente de correlação produtomomento (DIJKSHOORN; TOWNER; STRUELENS, 2001). A partir desses cálculos foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos. O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida do grau de relação linear entre variáveis quantitativas. Este coeficiente varia entre os valores -1 e 1, no qual o valor 0 (zero) significa que não há relação linear, o valor 1 indica uma relação linear perfeita e o valor -1 também indica uma relação linear perfeita mas inversa. Quanto mais próximo estiver de 1 ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis (SEWARD et al., 1997).

As análises de agrupamento dos genótipos foram obtidas a partir do método de média aritmética não ponderada (UPGMA), de modo a determinar matrizes de similaridade genética, com a construção de um dendograma (Bionumerics software version 6.0, Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.3.1 Obtenção do extrato enzimático

As raízes de mandioca foram descongeladas e trituradas na proporção 1:1 (m/V) com tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, 10 mM Ca²⁺. A pasta resultante foi filtrada para separação do extrato aquoso e resíduos sólidos da raiz.

O extrato foi submetido a centrifugação refrigerada a 4°C, 8000 g por 30 min, a fim de promover a decantação dos resíduos sólidos remanescentes. O sobrenadante foi submetido à diálise sob placa de agitação contra tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0, 10 mM Ca²⁺ por 24 horas, a 4°C. Após a diálise, o extrato enzimático foi armazenado a -18°C para posterior análise de atividade enzimática.

4.3.2 Determinação da atividade amilásica total

Para a determinação de atividade amilolítica foi empregado o método descrito

por Bernfeld et al. (1955). Uma alíquota de 50 µl do extrato enzimático dialisado foi adicionada a 500 µl de reagente DNS (1% de ácido 3,5-dinitro salicílico, contendo 30% [p/v] de tartarato de sódio e potássio, e 20% [p/v] de hidróxido de sódio 2M) e incubados a 100°C por 10 minutos, para a formação do complexo colorido entre os açúcares redutores e o DNS. A curva padrão foi obtida usando solução de glicose em concentrações entre 0,18 e 1,8 mg/mL. A solução foi diluída com a adição de 2,5 mL de água, e procedida a leitura da absorbância a 545nm. O método DNS, utilizado para a quantificação de açúcares redutores totais e a determinação da atividade enzimática, baseia-se na redução do ácido 3.5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração avermelhada (MILLER,1959).

Para a determinação da atividade amilásica, foi empregada solução de amido para avaliar a liberação de açúcares redutores provenientes da reação de hidrólise enzimática do amido através do método DNS. Uma alíquota de 150 μl do extrato enzimático dialisado foi incubada na presença de tampão fosfato contendo cloreto de cálcio, a 60°C por 10 minutos. Em sequência, foi adicionada solução de amido a 1% (p/v), e incubada a 60°C por 10 minutos, quando foi adicionado um volume de 500μl de reagente DNS, e a reação foi mantida a 100°C por 5 minutos. A reação foi interrompida com incubação a 4°C por 10 minutos, seguida da adição de 2,5 mL de água. Uma unidade de atividade amilásica (U) foi definida como sendo 10 μmol de açúcar redutor liberado/min/μg de mandioca.

4.4EXPRESSÃO GÊNICA

4.4.1 Padronização da extração de RNA total

As amostras de raiz de mandioca foram coletadas, processadas, e permaneceram sob armazenamento em freezer -20°C até o momento das análises. Para a extração de RNA, as raízes foram trituradas em moinho de facas, na presença de nitrogênio líquido para facilitar o processo de lise celular. O RNA total foi isolado a partir das raízes de mandioca, por extração com fenol-clorofórmio, conforme método implementado, modificado de Tangphatsornruang et al. (2005).

Alíquotas de 2 g foram transferidas para tubos Falcon esterelizados, onde foi

adicionado 2,5mL de tampão de lise (10mM de EDTA, 200mM de acetato de sódio, 1% de SDS, e 1% de polietilenoglicol) e 2,5mL de fenol. Após agitação, os tubos foram incubados a 4°C por 15 min. Os tubos foram centrifugados a 4300 rpm, em temperatura ambiente, por 10 min, a fim de promover separação das fases aquosa e orgânica. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado igual volume de solução fenol clorofórmio 1:1; os tubos foram homogeneizados por inversão, e centrifugados a 4300 rpm, em temperatura ambiente, por 10 min. A fase aquosa foi transferida para microtubos, com posterior adição de 1/3 ou 1/6 do volume de solução de LiCl 10M, para precipitação do RNA; os tubos foram incubados a 4°C por um período que variou de 2 a 4 horas. Os microtubos foram centrifugados a 14500 rpm, a 4°C, por 20 min, e o pellet de RNA foi lavado com 750 μL de etanol a 75%, e 750 μL de LiCl 2,5M. Após centrifugação a 14500 rpm, a temperatura ambiente, por 5 min, os tubos foram deixados em câmara de fluxo laminar até completa evaporação do etanol. Os pellets de RNA foram ressuspensos em 50 µL de água desionisada estéril livre de RNAse, e os extratos foram conservados em freezer -20°C.

Para o isolamento do RNA total, foi empregado também o método de extração de RNA através de resina de silica ligante (RNeasy Plant Mini Kit – Qiagen), conforme instruções do fabricante.

Síntese de c-DNA

Após o isolamento do RNA total, as concentrações das soluções foram determinadas por espectrofotometria a UV (espectrofotômetro SmartSpec™ Plus, BioRad) a 260nm, sendo:

1,0 D. O. $A_{260} = 50 \mu g/mL$ de DNA fita dupla

1,0 D. O. $A_{260} = 42 \mu g/mL$ de RNA (Sambrook & Russel, 2001).

A pureza destas soluções foi estimada pela razão das absorbâncias entre 260 e 280nm.

Os extratos de RNA total foram avaliados através do perfil eletroforético, e da reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (RT-PCR). Para síntese do c-DNA, foi utilizado o kit TaqMann Reverse Transcripation Reagentes (Applied Biosystems, Estados Unidos), em três etapas: incubação inicial a 25°C por 10 min;

ativação da enzima RT a 48°C por 30 min; inativação a 95°C por 5 min. Em seguida, o c-DNA foi utilizado como template na segunda etapa da RT-PCR, realizada conforme descrito anteriormente, com os oligonucleotídeos A4/AF4, e Endo 1/Endo 2, correspondentes aos gene da α-amilase e actina, respectivamente.

4.4.2 RT-PCR em tempo real

Para a análise da expressão dos genes *MEAMY* e *GBSSI* foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 5. O controle interno, gene endógeno e constitutivo, foi o gene da actina de *M. esculenta*. A determinação dos níveis de expressão foi conduzida através de RT-PCR em tempo real. As amostras de extrato de RNA obtidas foram utilizadas como molde para as reações de transcrição reversa seguidas de PCR em tempo real. Essas reações foram conduzidas no termociclador ABIPRISM SDS 7000 (Applied Biosystems), utilizando como agente fluoróforo o corante SYBR Green (Kit SYBR Green RT-PCR – Applied Biosystems).

Tabela 5 – Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR em tempo real

Oligonucleotídeo	Sequência	Sequência homóloga	Fragmento esperado
Endo 1	CATGAGACTACATACAACTCCATC	Gene	175 pb
Endo 2	TCGTACTCAGCCTTGGCAATCCAC	actina	
A4	CTGATAGATGATCGACTATTG	Gene	273 pb
AF4	GCCACCTTCTAGTCAGTC	amilase	
GBSS 1	TGCCTTCTCAGACTTCCCACG	Gene amido sintase	264 pb
GBSS 2	GACCACCAGTAGAGCAACAATGGG	ligada ao grânulo l	

Para síntese do c-DNA, foi utilizado o kit TaqMann Reverse Transcription Reagentes (Applied Biosystems, Estados Unidos), em três etapas: incubação inicial a 25°C por 10 min; ativação da enzima RT a 48°C por 30 min; inativação a 95°C por 5 min. Em seguida, o c-DNA foi utilizado como molde na segunda etapa da RT-PCR em tempo real (quantificação relativa), com os oligonucleotídeos descritos na tabela 5. Nas reações, preparadas em triplicata, foi usado o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), conforme protocolo proposto pelo fabricante.

A eficiência da reação de amplificação para cada par de primers do gene estudados e do normalizador foi estimada por meio de uma série de diluições do cDNA (100 a 10-10), onde foram testadas diferentes concentrações dos primers (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 µmol L⁻¹). Os valores de Ct (ciclo de "threshold") obtidos foram traçados em função do logaritmo das diluições, e o coeficiente angular foi utilizado para calcular a eficiência de cada sistema, de acordo com a fórmula E = [10⁻¹] ^{1/declividade}]-1. Os parâmetros de ciclagem utilizados para as reações foram: ativação da enzima a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 seg para a hibridização, e extensão a 60°C por 1 min. Os dados foram coletados nesta última etapa. Adicionalmente, foi conduzida uma etapa de desnaturação lenta, com elevação da temperatura de 1°C por min para a construção da curva de dissociação, o que permitu a discriminação entre o sinal de fluorescência emitido pelos fragmentos amplificados e possíveis interferentes tais como dímeros de oligos, e amplificados inespecíficos. Considerando que os fragmentos gerados apresentam temperatura de desnaturação específica, é possível detectar a presença de amplificação inespecífica em uma mesma reação.

Como controles, foram conduzidas reações onde o c-DNA foi substituído por água livre de RNases (controle negativo), e RNA extraído a partir das amostras, a fim de avaliar possível contaminação com DNA genômico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTOS EXPLORATÓRIOS – EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA é uma etapa importante na execução das análises subsequentes, sendo necessária máxima eficiência para confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. A eficiência da extração de DNA e sua pureza são fatores determinantes do sucesso da análise por PCR. Em geral o DNA isolado a partir de plantas deve ser isolado de lipídeos, proteínas, polissacarídeos e sais, pois estes podem exercer efeito inibitório sobre a DNA polimerase, sobretudo pela existência de nucleases e proteases ativas após o rompimento de células e tecidos.

Dois métodos de isolamento de DNA a partir das amostras de folha de mandioca foram avaliados. Usando o kit DNeasy foi possível isolar DNA genômico amplificável, a partir de folhas de mandioca, conforme observado na Figura 14.

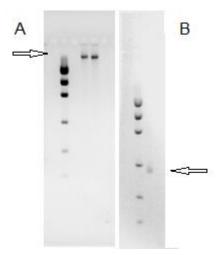


Figura 14 – Gel de agarose, revelado com brometo de etídio, com DNA isolado a partir de folha de mandioca (DNeasy); A: DNA genômico; B: reação PCR; padrão – 100 bp DNA ladder.

Foi possível isolar DNA a partir de folhas de mandioca através do protocolo Dellaporta (Figura 15a). Entretanto, não foi possível amplificar o fragmento correspondente ao gene da actina (Figura 15b), o que indica que o DNA isolado pode apresentar contaminantes que prejudicaram a reação de PCR. A Tabela 6

apresenta os resultados de quantificação do DNA isolado, onde é possível observar maior taxa de recuperação com a utilização do protocolo DNeasy Este dado é compatível com os resultados de PCR, de onde conclui-se que o método DNeasy permitiu a extração e isolamento de DNA amplificável e em quantidade satisfatória para as análises RAPD.

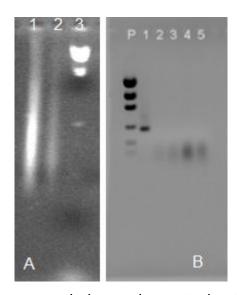


Figura 15 – Gel de agarose, revelado com brometo de etídio, com DNA isolado a partir de folha de mandioca (Dellaporta); A: raias 1 e 2: DNA genômico; raia 3: Padrão DNA lambda Hind III; B: reação PCR (P 100 bp DNA ladder; raia 1: PCR DNA DNeasy; raias 2 e 3: Dellaporta 50 mg; raias 4 e 5: Dellaporta 100 mg).

Tabela 6 – Quantificação dos extratos de DNA

	Concentração	Recuperação (μg)	Relação
	inicial []		A ₂₆₀ / A ₂₈₀
	(μg/mL)		
DNeasy	688,404	137,681	1,0059
Dellaporta			
50mg de folha	67,5 <u>+</u> 0,3*	3,373*	2,0 <u>+</u> 0,5*
100mg de folha	303,969	15,198	1,7022

^{*} extrações em triplicata;

Assim, o método DNeasy foi empregado na extração de DNA das 30 amostras de mandioca avaliadas quanto à diversidade genética, conforme observado na Figura 16.

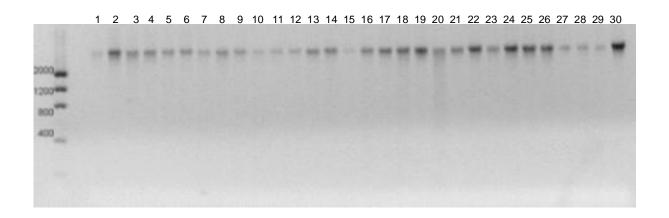


Figura 16 – Gel de agarose, revelado com brometo de etídio, com DNA isolado de 30 amostras de folha de mandioca (DNeasy); padrão: 100 bp DNA ladder.

5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA

Um requisito prévio para programas de melhoramento genético de mandioca é o conhecimento prévio acerca da extensão de variabilidade genética entre cultivares, e a distância filogenética entre a mandioca e espécies relacionadas, com as quais pode haver o cruzamento (BEECHING et al, 1993). Dentre os vários métodos disponíveis, aqueles baseados em análises de produtos de PCR, como a técnica RAPD, são recomendados por serem simples e rápidos, além de permitir bons níveis de discriminação (PULIDO et al., 2005) e reprodutibilidade (RAMOS et al., 2008).

Inicalmente, nove amostras de mandioca foram utilizadas no estudo de diversidade genética, tendo como critério de escolha a viabilidade e ponto de coleta das mesmas. As folhas foram empregadas no protocolo de extração de DNA utilizando o kit DNeasy, na qual o material genético de interesse é adsorvido em resina de silica modificada. As reações de PCR-RAPD foram conduzidas a partir de 20 oligonucleotídeos do kit Operon W, e nove amostras, as quais forneceram 180

entradas no banco de dados para posterior análise de diversidade genética.

O efeito da variação de concentração de DNA genômico na reação, dentro da faixa de 50 a 200ng também foi avaliado. O melhor resultado obtido foi a concentração de 50ng/reação. A reação de amplificação foi feita com volume final de 50µL onde a concentração e os componentes utilizados na reação estão especificados no item 4.2.2. Segundo Willians et al. (1993), as principais variáveis a serem determinadas para a realização da técnica de RAPD são concentrações altas de DNA e magnésio, que podem ocasionar perda de bandas, enquanto que concentrações baixas originam bandas não reproduzíveis.

Considerando-se um determinado iniciador, os produtos de amplificação via RAPD, podem ser classificados em dois grupos: variáveis (polimórficos) e constantes (não polimórificos). As análises de PCR-RAPD permitiram a obtenção de padrões de fragmentos amplificados distintos, no que diz respeito ao número e a intensidade das bandas observadas no gel de agarose, para todas as variedades de mandioca avaliadas. O número de fragmentos polimórficos gerados por oligonucleotídeo variou de 2 a 19, e o tamanho dos fragmentos variou de ± 450 a ± 2100pb (Figuras 17 a 33). Estudos anteriores relatam a amplificação de três a quinze fragmentos para cada oligo (GOSTIMSKY; KOKAEVA; KONOVALOV, 2005). Asante & Offei (2003) descreveram a ocorrência de 8 a 12 fragmentos polimórficos por oligo, na análise de variedades de mandioca. Maia e colaboradores (2009) observaram a presença de bandas polimórficas na análise de variedades de uva entre 3 a 13 por iniciador.

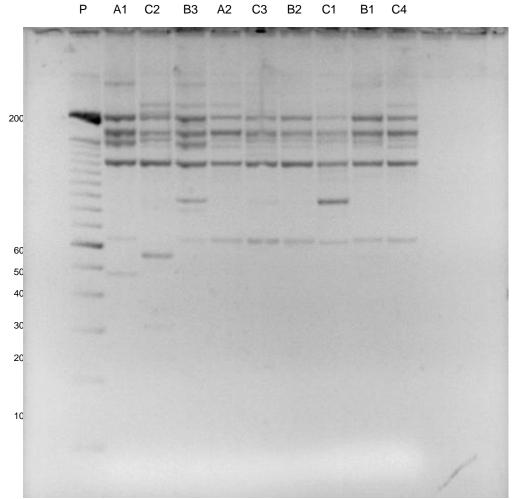


Figura 17 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW01 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

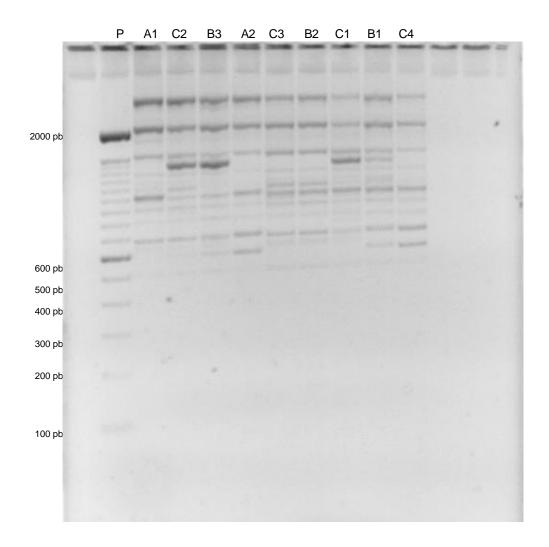


Figura 18 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW02 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

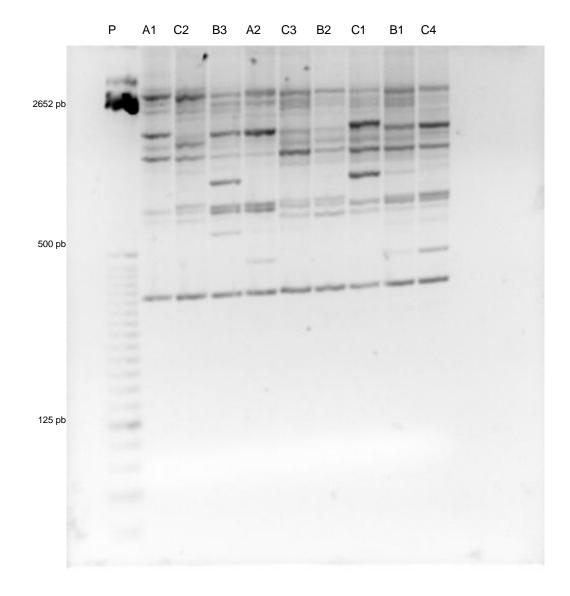


Figura 19 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW03 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

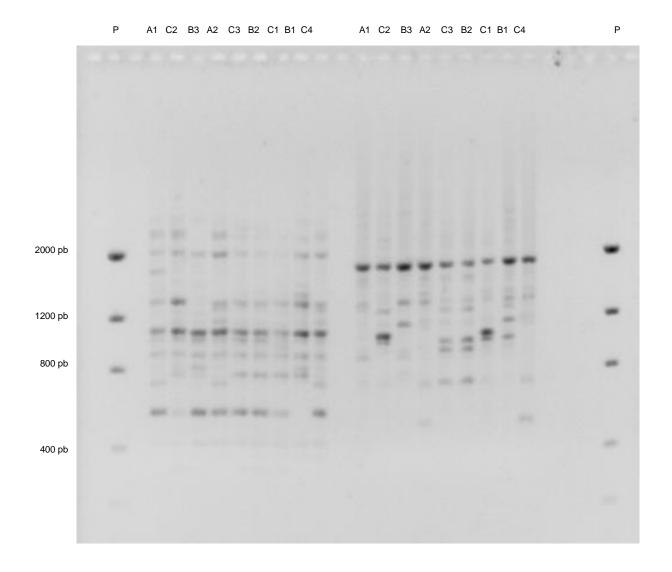


Figura 20 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando os primer OPW04 (a esquerda)/OPW11 (a direita), e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

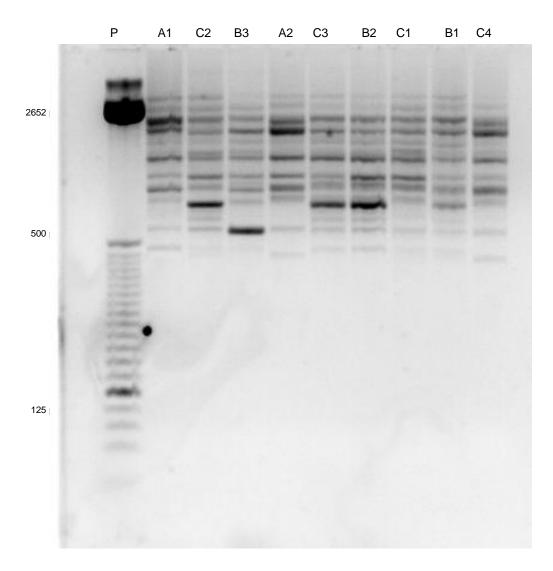


Figura 21 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW05 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

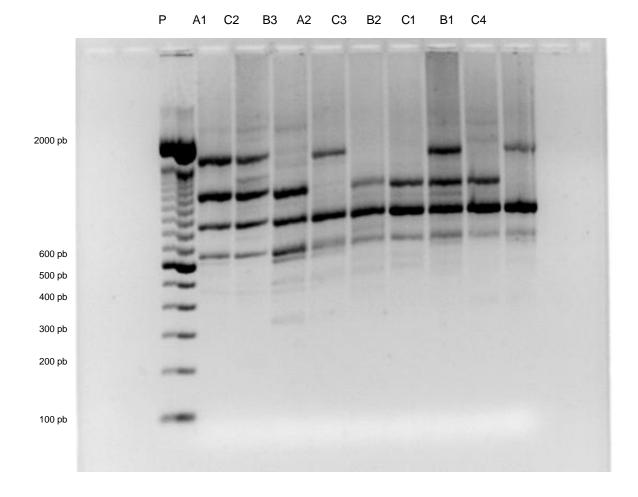


Figura 22 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW06 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

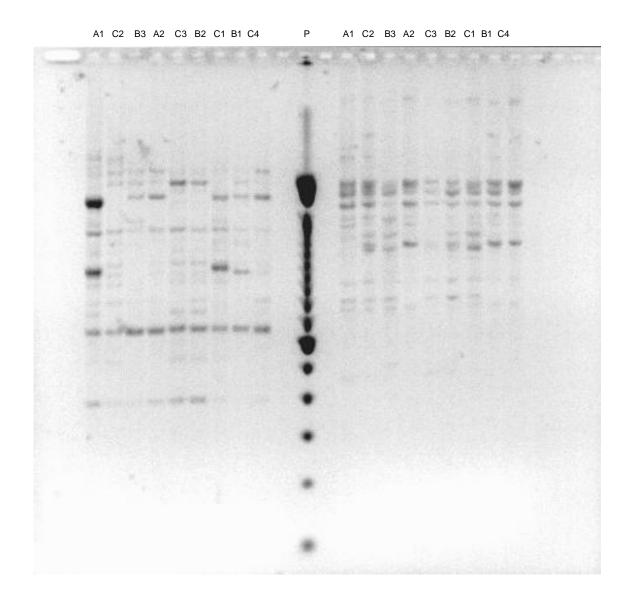


Figura 23 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW07 (a esquerda)/OPW08 (a direita), e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

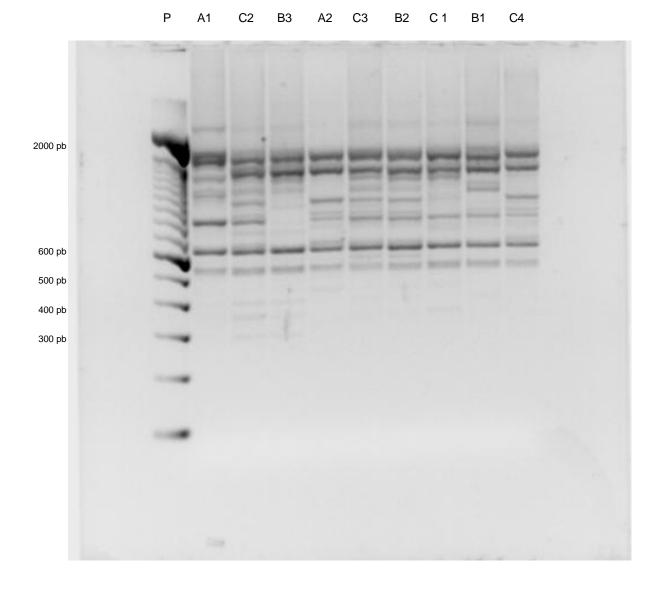


Figura 24 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW09 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

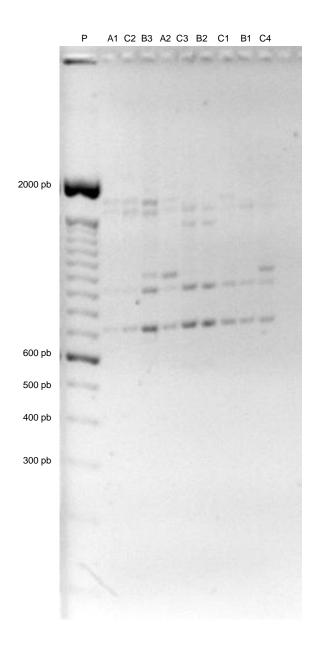


Figura 25 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW10 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

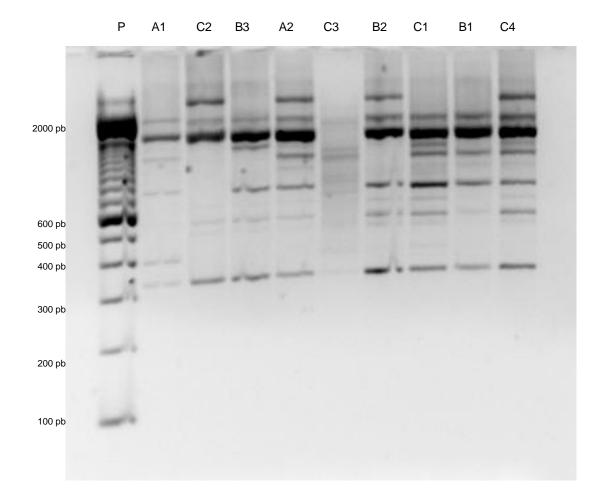


Figura 26 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW13 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

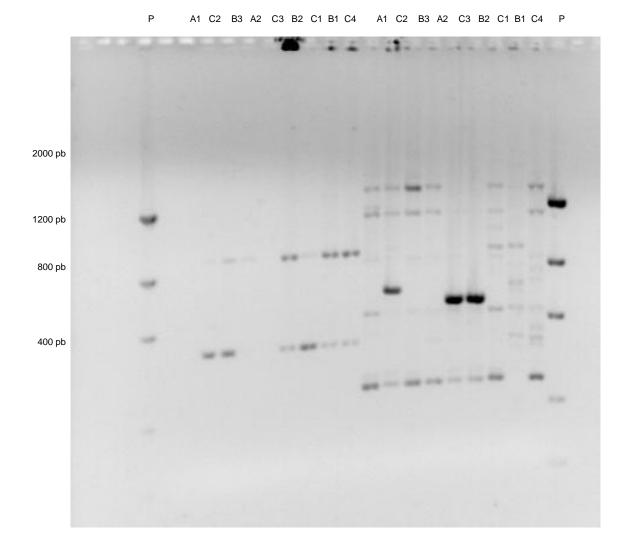


Figura 27 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW14 (a esquerda)/OPW19 (a direita) e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

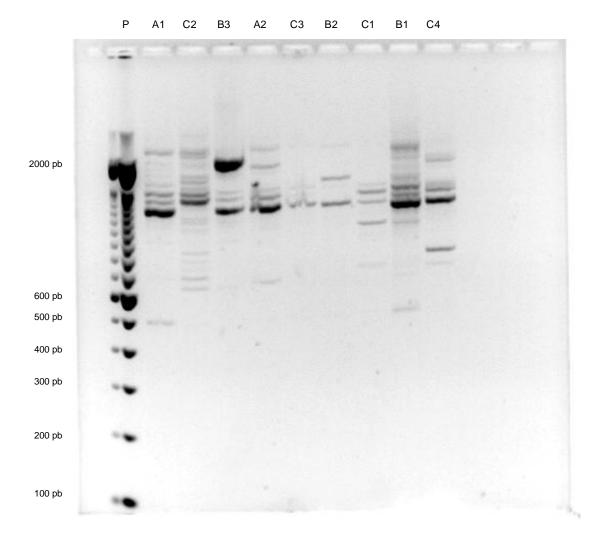


Figura 28 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW15 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

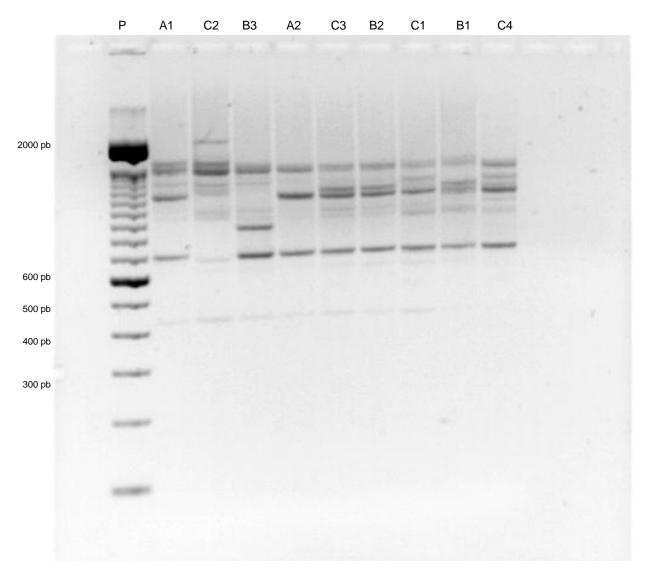


Figura 29 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW16 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

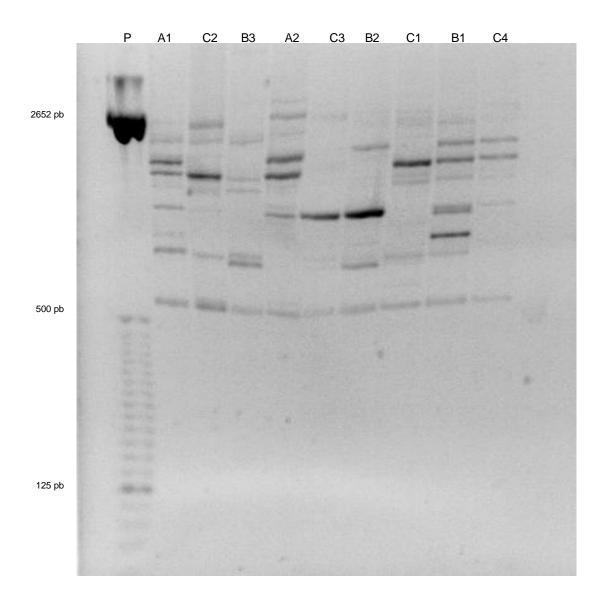


Figura 30 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW17 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

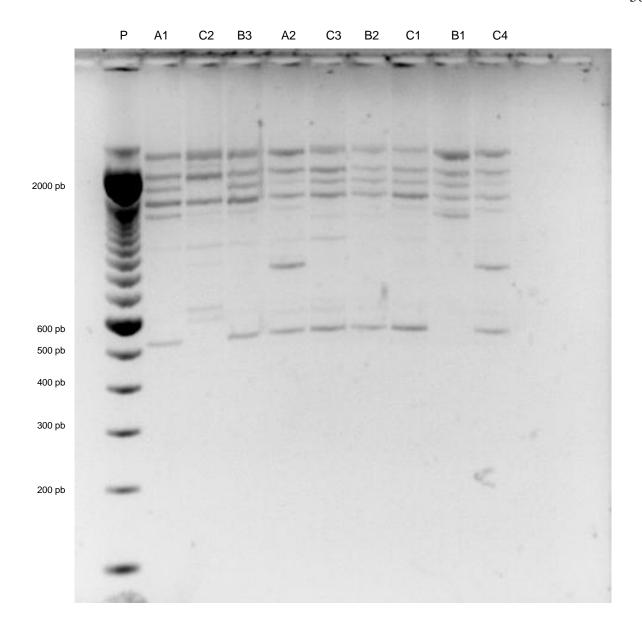


Figura 31 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW18 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

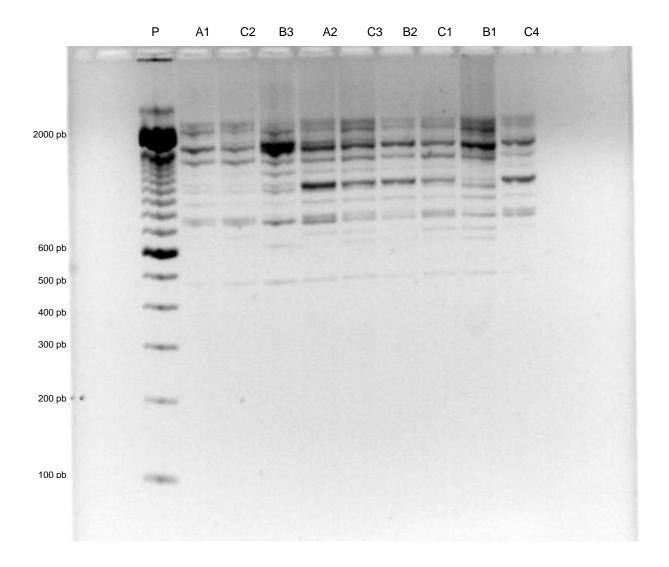


Figura 32 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW20 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca.

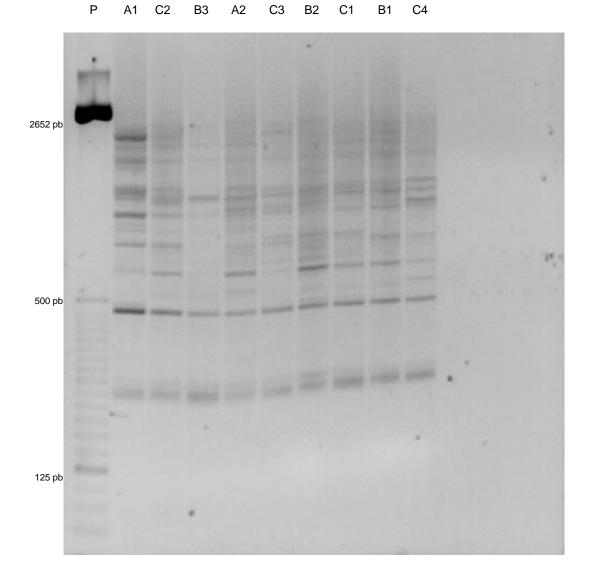


Figura 33 - Gel de agarose, corado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW12 e o DNA isolado de nove amostras de mandioca. P: Low mass DNA ladder.

Este resultado demonstra o emprego da técnica de RAPD na discriminação de genótipos, permitindo sua utilização na identificação de cultivares também de mandioca. Na análise do perfil obtido de bandas polimórficas a partir da amplificação, utilizando inicialmente nove amostras de mandioca (descritas na tabela 3), foi possível eleger o oligonucleotídeo OPW12 (Figura 33) para posterior análise de todo o grupo amostral de 30 variedades de mandioca. A escolha do OPW12 se deu em função da qualidade da imagem capturada, do número de bandas, e da presença de bandas polimórficas que permitiram a distinção entre as variedades estudadas. SCHILLINGER et al. (2009) utilizaram RAPD na diferenciação de linhagens de *Lactobacillus* em iogurtes probióticos, onde escolheram o iniciador M13 para a construção do dendograma de similaridade genética. Outros estudos descrevem a escolha de um oligo na obtenção dos padrões de bandas polimórficas para análise de diversidade genética por RAPD em bactérias (SEWARD et al.,1997) e azeite de oliva (BUSCONI et al. 2003).

Após a escolha do oligonucleotídeo OPW12, foram conduzidas novas reações de amplificação RAPD, a partir do DNA isolado de folhas das 30 amostras de mandioca utilizando o kit DNeasy. O fracionamento em gel de agarose dos produtos de amplificação das amostras reunidas encontra-se na Figura 34. É possível identificar a presença de bandas polimórficasa de fragmentos de DNA, na análise comparativa das diferentes amostras avaliadas no experimento.

O perfil obtido por RAPD (fingerprint) a partir da amplificação com o oligonucleotídeo OPW12 foi analisado através de um programa computacional (Bionumerics), a fim de construir o dendograma de similaridade genética (Figura 35).

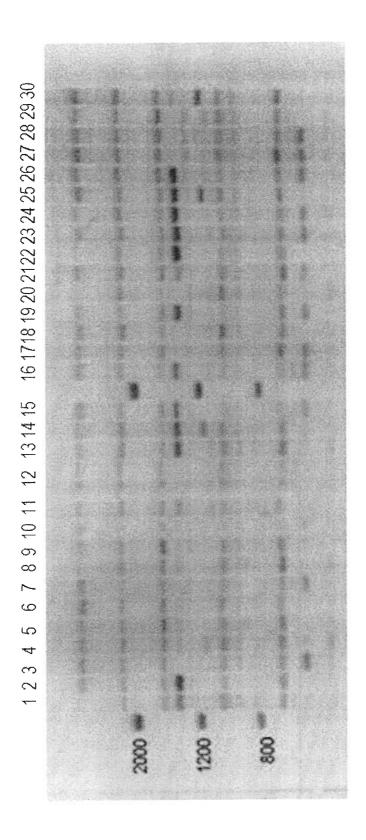


Figura 34 - Gel de agarose, revelado com brometo de etídio, com os produtos de amplificação da PCR-RAPD, utilizando o primer OPW12 e o DNA isolado de 30 amostras de mandioca (aplicadas no gel 1 → 30). P: 100bp DNA ladder.

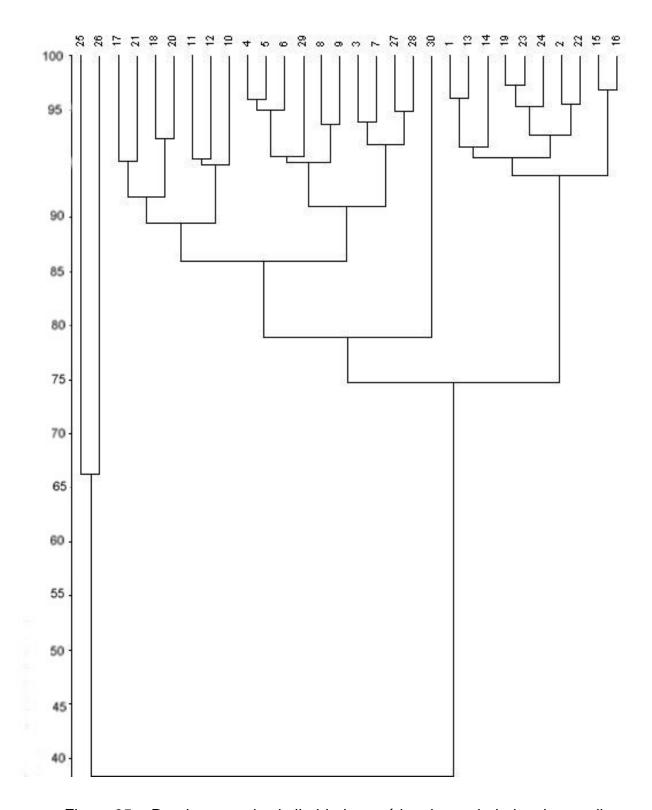


Figura 35 - Dendograma de similaridade genética das variedades de mandioca.

Os padrões de fragmentos amplificados por RAPD-PCR foram agrupados segundo o coeficiente de Pearson.

Os marcadores RAPD gerados foram agrupados pelo coeficiente de correlação de Pearson, e o método de UPGMA foi utilizado para construir o dendograma (Figura 35). Dendogramas, com resultados expressos em termos de valores percentuais de correlação, baseados em matrizes de similaridade calculadas a partir do coeficiente de Pearson, são utilizados em outros estudos de diversidade genética (PULIDO et al., 2005; SCHILLINGER et al., 2003). Este coeficiente é a medida da correlação linear simples entre os perfis de produtos de amplificação.

Neste estudo, foi observada diversidade intraespecífica entre as variedades de mandioca estudadas, resultado que está de acordo com estudos anteriores de diversidade genética de mandioca (PERONI; HANAZAKI, 2002). A análise do dendograma permite a identificação de 3 grupos, nas quais 28 das 30 amostras estão distribuídas a 75% de similaridade genética, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição genética baseada na matriz de similaridade das amostras avaliadas neste estudo

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
17 - Jabuti	4 - Brebi	1 – Perereca LP
21 - Achada	5 – Pororoca LP	13 – Chabé
18 – Macaxeira amarela	6 – Achada mar	14 - Tucunaré
20 - Murutá-Tingá	29 - Jabuti	19 – Açaí-Tingá
12 – Gunguinha AT	8 – S. Lorival	23 – Açaí-Tauá
11 – Macaxeira AT	9 – Amarelinha AT	24 – Domingo Tauá
10 – Manicueira branca AT	3 – Coaraci LP	2 – Milagrosa LP
	7 – Coraci Amarela LP	22 – Arara amarela
	27 – Peixe-boi	15 – Bacuri Caiana
	28 - Tartaruga	16 – Mocototó Amarela
	30 - Manicueira	

Tais amostras apresentaram genótipos semelhantes, nos seus grupos respectivos, com coeficiente de similaridade de 85% (grupo 1), 86% (grupo 2) e 89% (grupo 3). Estes achados possivelmente se devem a cruzamentos empíricos realizados para melhoramento das variedades de mandioca.

Duas amostras (25 e 26) foram posicionadas na extremidade do dendograma,

e apresentaram distância genética em relação aos outros cultivares. Estas variedades apresentaram polimorfismos não observados nas outras amostras. Estes achados sugerem que as variedades 25 e 26 apresentam menor similaridade genética.

Outro estudo avaliou a diversidade genética de cultivares de mandioca também (ASANTE: OFFEI. 2003), е demonstrou diversidade genética intraespecífica, já que a divergência interpopulacional foi de 0.069 a 0.203. No referido estudo, 47 das 50 variedades avaliadas apresentaram 63% de similaridade genética. As amostras também se encontravam distribuídas em 3 grupos, sendo um deles com o agrupamento das 47 variedades supracitadas, e as outras 3 amostras dispostas em 2 grupos, com maior distância genética. Mühlen, Martins e Ando (2000) investigaram a similaridade genética em cultivares de mandioca da Região Amazônica e São Paulo, e descrevem índice de similaridade avaliado por RAPD de 0,87, valor próximo dos resultados apresentados acima.

5.3 ATIVIDADE AMILOLÍTICA

A degradação de amido fornece a fonte primária de carbono pela liberação de açúcares redutores (ROSS; DAVIES, 1987). Nos extratos enzimáticos das raízes de mandioca foi determinada atividade amilásica a fim de investigar sua relação com o perfil de diversidade genética, e expressão gênica da α-amilase. O método selecionado para tal análise foi a quantificação de açúcares redutores liberados na reação, através de uma escala colorimetrica obtida pelo DNS, e comparada com padrão de glicose, já descrito em estudos anteriores (AZAD et al., 2009; GONZÁLEZ; FARIÑA, FIGUEROA, 2002). Determinações baseadas no poder redutor apresentam como limitação a mensuração simultânea das atividades exo- e endo-amilase, e possível interferência dos açúcares presentes na amostra. Para aumentar a eficácia da análise, os extratos enzimáticos foram submetidos a diálise para remoção dos açúcares. Os valores de atividade enzimática encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Atividade amilolítica em variedades de mandioca selecionadas¹

Amostra	1U = 10µmoles de glicose/min/µg raíz
	do gilocco/iiii/µg fai2
1	3,12
2	3,84
3	3,44
4	3,27
5	1,95
6	2,94
7	2,87
8	2,45
9	2,66
10	2,57
11	1,78
12	1,88
13	2,14
14 15	3,53
16	2,09 1,58
17	3.99
18	4,17
19	1,95
20	1,48
21	1,56
22	2,32
23	3,18
24	3,43
25	2,97
26	3,15
27	3,85
28	2,42
29	2,68
30	2,36

¹ Ensaios em triplicata.

A faixa de atividade α-amilásica das amostras revelou-se similar a de trabalhos anterior realizados em nosso laboratório. Foi verificado que a atividade máxima da α-amilase mantem-se estável a 60°C, na presença de ions Ca²+ e em pH 6,0 contendo 10 mM Ca²+, por 90 min, conservando 80% da atividade inicial após 15 h de incubação na mesma temperatura (VEIGA, 2002). Essa temperatura inativa outras possíveis enzimas amilolíticas presentes nos extratos. Os resultados aqui obtidos são compatíveis com a atividade de cerca de 2 U naquele estudo, no qual

foram avaliadas seis variedades de mandioca, sendo que em apenas uma não houve detecção da atividade enzimática.

Raízes e tubérculos muitas vezes expressam enzimas amilolíticas durante o processo de brotamento. No caso de outras raízes originárias da América do Sul, como batata doce (Ipomeae batatas), mandioquinha (Arracacia xanthorrhiza), e maca (Lepidium meyeni) ocorre grande variação de comportamento nas amilases. Em batata doce, ambas α e β amilases são importantes para liberação de açúcares fase de desenvolvimento pleno, independentemente do brotamento (HAGENIMANA et al., 1994). Na mandioquinha-salsa foram detectadas três enzimas amilolíticas, duas α-amilases e uma β-amilase (PIRES; VEIGA; FINARDI FILHO, 2002). Na maca uma enzima com atividade α e uma β estão presente, sendo a mais ativa e abundante a β-amilase (RONDAN-SANABRIA; PIRES; FINARDI FILHO, 2006). Em todas estas raízes encontra-se a característica de sabor doce após cocção.

A presença de α-amilase em raízes de mandioca não está relacionada ao mecanismo de reprodução vegetativa da planta, visto que nesta espécie o replantio é realizado a partir de segmentos do caule. No entanto, evidencia sua possível compartimentalização para posterior mecanismo de ativação enzimática através da ação de giberelinas (TANGPHATSORNRUANG et al., 2005).

Como não houve avaliação de atividade amilolítica em estágios anteriores de desenvolvimento e maturação nas raízes de mandioca empregadas no presente trabalho, não foi possível inferir o papel desta ação enzimática ao longo do processo de secagem para preservação e comercialização das raízes, pois as mesmas foram processadas e congeladas no mesmo dia da coleta no município de Seropédica, RJ.

5.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

Os teores de açúcares (glicose, frutose, sacarose e maltose) foram determinados por cromatografia líquida conforme descrito na Tabela 9. Observa-se que as amostras 1, 5, 11, 12, 16 e 19 apresentaram teores de glicose inferiores a 0,2 g/100g de mandioca. Foi observado que a amostra 17 apresentou maior concentração de glicose (2,65 g/100g). Já para maltose, somente duas amostras (6 e 7) apresentaram teores detectáveis, em baixa concentração (0,11 e 0,06 g/100g)

respectivamente). A baixa detecção de maltose entre os mono e dissacárides analisados, permite inferir que não houve ação hidrolítica de β-amilase nas raízes e que a presença remanescente de açúcares se deva sobretudo a resíduos da síntese de açúcares, acima de possíveis mecanismos de hidrólise de amido.

A Figura 36 apresenta os resultados descritos nas Tabelas 8 e 9, segundo as variedades de mandioca avaliadas. Não houve clara correlação entre os teores de açúcares das amostras e a atividade amilolítica detectada. Assim, o aparecimento de açúcares simples pode estar relacionado a ação de enzimas endofíticas, bem como outros fatores ainda não elucidados.

Tabela 9 – Teores de açúcares (g/100g) em raízes de mandioca¹

amostra	frutose	glicose	sacarose	maltose
1	ND	0,14	1,51	ND
2	0,05	0,27	1,24	ND
3	0,08	0,26	1,21	ND
4	0,22	0,49	1,1	ND
5	ND	0,16	0,78	ND
6	0,88	0,96	1,84	0,11
7	0,11	0,68	2,28	0,06
8	0,2	0,38	1,49	ND
9	0,85	1,33	1,73	ND
10	0,89	1,4	1,78	ND
11	0,07	0,18	0,81	ND
12	0,05	0,15	0,82	ND
13	ND	0,36	1,24	ND
14	0,18	0,63	2,6	ND
15	0,08	0,3	0,85	ND
16	0,06	0,17	0,42	ND
17	1,83	2,65	0,52	ND
18	0,52	0,9	2,48	ND
19	0,11	0,16	0,43	ND
20	0,04	0,35	0,8	ND
21	0,05	0,41	1,0	ND
22	0,14	0,35	0,97	ND
23	0,11	0,29	0,8	ND
24	0,34	0,98	1,23	ND
25	0,28	0,51	0,93	ND
26	0,47	0,53	1,61	ND
27	1,10	1,56	0,15	ND
28	0,25	0,53	0,69	ND
29	0,49	0,78	1,14	ND
30	0,09	0,24	1,59	ND

¹ Ensaios em duplicata; ND: quantidade não detectável.

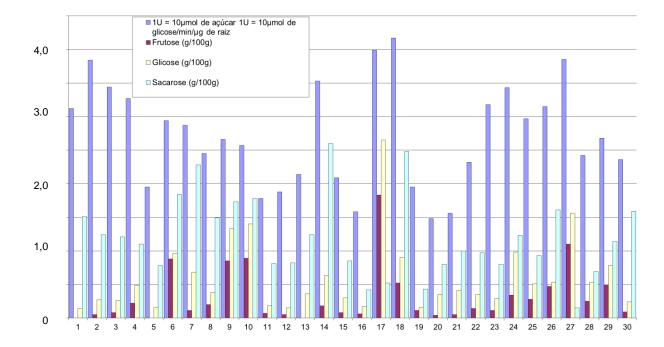


Figura 36 – Determinação de atividade enzimática e concentração de açúcares totais. Dados comparativos referentes aos valores das Tabelas 8 e 9, respectivamente.

5.5 EXPRESSÃO GÊNICA DA α -AMILASE

O isolamento de RNA, tornando-o livre de contaminantes como DNA genômico e metabólitos secundários da planta (compostos fenólicos, entre outros), é essencial para o sucesso na amplificação do c-DNA correspondente e correta análise dos resultados (CHOMCZYNSKY; SACCHI, 1987). Para tal, é necessário padronizar a metodologia de isolamento de RNA, e avaliar a capacidade de amplificação do c-DNA correspondente (DANTAS et al., 2002).

No caso presente, foi possível isolar o RNA a partir de amostras de raízes de mandioca, através da extração de RNA e emprego de resina de silica ligante (RNeasy Plant Mini Kit – Qiagen), seguindo estudos anteriores (SIJU; MADHUBALA; BHAT, 2007). Desse modo, 30 amostras foram avaliadas quanto ao perfil de expressão gênica da α–amilase. As alíquotas em duplicata das raízes das variedades foram submetidas à extração de RNA total utilizando o kit RNeasy. O RNA assim isolado foi empregado na RT-PCR em duas etapas: síntese do c-DNA, e amplificação em tempo real. A obtenção de cDNA com transcriptase reversa foi mais eficiente com a utilização do "random primer", como também descrito por Dantas et al. (2002).

As curvas de amplificação obtidas na reação de RT-PCR em tempo real representam a detecção do sinal fluorescente normalizado (Rn) no decorrer da reação, transcorrida em 40 ciclos. Ao final da análise, foi determinado um nível arbitrário de fluorescência na fase exponencial da amplificação (threshold), onde foi determinado o número do ciclo da PCR no qual a fluorescência atinge o threshold (Ct – ciclo threshold). Neste ponto, os dados foram coletados, e empregados na quantificação relativa para determinar o nível de expressão gênica dos genes *Meamy2* e *GBSS*, usando como gene de referência a actina.

O calibrador foi escolhido foi a amostra 21. Assim, seus dados de variação de Ct foram considerados como padrão relativo de expressão (Tabela 10) para a construção dos histogramas (Figuras 37 e 38).

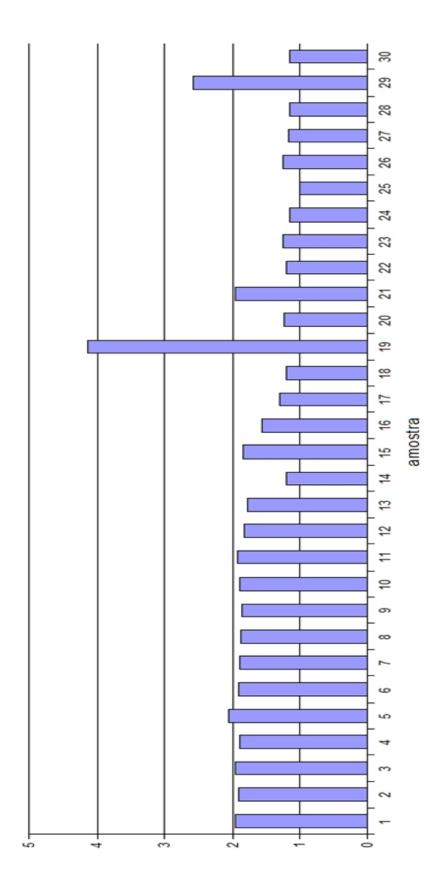


Figura 37 – Quantificação relativa de expressão gênica da amilase em mandioca

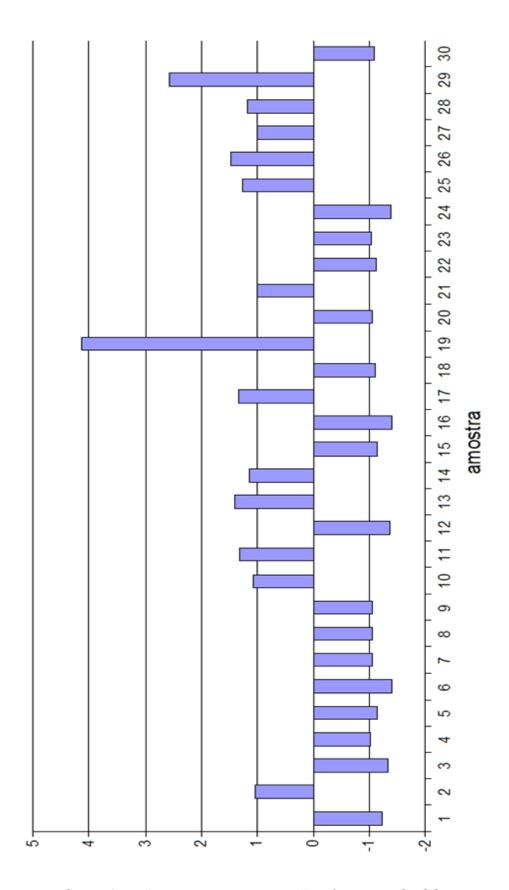


Figura 38 – Quantificação relativa de expressão gênica de *GBSS* em mandioca.

Tabela 10 – Expressão relativa para os genes alvo Meamy2 e GBSS

	Expressão relativa amila-	Expressão relativa
Amostra	se	GBSS
1	1,97	-1,23
2	1,91	1,03
3	1,97	-1,33
4	1,9	-1,02
5	2,04	-1,14
6	1,92	-1,4
7	1,89	-1,05
8	1,88	-1,05
9	1,86	-1,05
10	1,9	1,06
11	1,93	1,31
12	1,84	-1,36
13	1,78	1,4
14	1,2	1,14
15	1,85	-1,14
16	1,57	-1,4
17	1,31	1,32
18	1,2	-1,1
19	4,15	4,13
20	1,23	-1,05
21	1,97	1
22	1,2	-1,13
23	1,25	-1,03
24	1,15	-1,39
25	1	1,26
26	1,25	1,46
27	1,18	1
28	1,15	1,17
29	2,58	2,58
30	1,16	-1,08

A análise da expressão relativa da α-amilase demonstrou discreta variação entre as amostras analisadas. Em relação ao calibrador (mandioca 25), a maior parte das amostras apresentou expressão gênica de *Meamy2* com valores absolutos entre 1 e 2, exceto para as variedades 5, 19 e 29. Entretanto, somente a amostra 19 (variedade Açaí-Tinga) apresentou variação expressiva na quantificação relativa (4,15).

Estudos relacionando o papel da α-amilase, e seus padrões de expressão

gênica são muito limitados, sobretudo em raízes e tubérculos. Em batata, o papel da α -amilase na degradação de amido é controverso, e informações adicionais sobre os mecanismos bioquímicos são necessárias (DAVIES, 1990). YAMAUCHI, TAKEUCHI e MNAMIKAWA (1994) demonstraram que os níveis de mRNA de α -amilase e atividade amilásica em feijão estão elevados durante os primeiros dias de germinação, indicando que a enzima é responsável pelo ataque aos grânulos de amido. Em mutantes de *Arabidopsis thaliana*, apresentando três genes de α -amilase silenciados, foi observada taxa normal de degradação de amido, indicando que a enzima não é essencial, ou que a pode conter uma nova proteína com atividade endoamilásica (SMITH, A.; ZEEMAN; SMITH, C., 2005).

Os padrões de expressão relativa da enzima de síntese de amido pouco diferiram entre os cultivares avaliados. Na análise comparativa de expressão gênica baseada no Ct, a maior parte das amostras apresentou expressão gênica de *GBSSI* entre -1,5 e 1,5, relativa ao calibrador (amostra 21), exceto para as amostras 19 (variedade Açaí-Tinga) e 29 (Jabuti). Na análise dessas raízes foi observada variação expressiva na quantificação relativa (4,13 e 2,58 respectivamente).

Alguns trabalhos investigaram a expressão da enzima de síntese de amido ligada ao grânulo. Baguma e colaboradores (2003) relatam expressão gênica de *GBSSI* elevada em folhas e não detectável em raízes de mandioca 180 dias após o plantio.

O cruzamento dos dados de expressão gênica de α-amilase com a presença de açúcares e atividade amilolítica, bem como com o perfil de similaridade representado pelo dendograma entre as raízes testadas estão desvinculados, não havendo correlação.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com as amostras de folhas e raízes de mandioca oriundas da região amazônica, avaliadas neste trabalho, podemos concluir que:

- O método de RAPD permitiu a identificar e distinguir a variabilidade genética de mandiocas, através do oligonucleotídeo OPW-12;
- 2. O perfil de diversidade genética identificado revelou a existência de três grupos distintos de plantas, contendo 28 das 30 variedades analisadas, com similaridade genética acima de 85% e além de um quarto grupo isolado com as duas variedades restantes;
- 3. A metodologia empregada permite sua aplicação em projetos futuros para rastrear a dispersão de variedades de mandioca;
- 4. Os padrões de expressão gênica, por quantificação relativa dos genes para amilase e amido sintase ligada ao grânulo, foram semelhantes para as variedades de mandioca avaliadas:
- 5. A atividade amilolítica detectada nas raízes apresentou variação para as amostras, entretanto não está diretamente relacionada aos teores de açúcares, sugerindo mecanismos distintos para a liberação de açúcares nas raízes.

REFERÊNCIAS

- ADETAN, D. A.; ADEKOYA, L. O.; ALUKO, O. B. Characterization of some properties of cassava root tubers. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 349-353, 2003.
- AFOAKWA, E. O.; SEFA-DEDEH, S. Changes in rheological properties and amylase activies of trifoliate yam starch after harvest. **Food Chemistry**, v. 77, p. 285-291, 2002.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 617-631, 2008.
- ALVES, R. M. L.; GROSSMANN, M. V. E.; SILVA, R. S. S. F. Gelling properties of extruded yam starch. **Food Chemistry**, v.67, p. 123-127, 1999.
- ANTRIM, R. L. et al. New isomerization technology for high fructose syrup production. **Starch**, v. 41, n. 4, p.155-159, 1989.
- ARAÚJO, E. S., et al. Uso de RAPD para análise de variabilidade genética em arroz. **Agronomia**, v.37, n. 1, p. 33-37, 2003.
- AREAS, J. A. G.; LAJOLO, F. M. Starch transformation during banana ripening: I-The phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminate*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 5, p. 19-37, 1981.
- ASANTE, I. K.; OFFEI, S. K. RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (Manihot esculenta Crantz) genotypes. **Euphitica**, v. 131, p. 113-119, 2003.
- AZAD, A. K. et al. Isolation and characterization of a novel thermostable amylase from Korean pine seeds. **New Biotechnology**, v. 26, p. 143-149, 2009.

- BAGUMA, Y. et al. Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (Manihot esculenta Crantz). **Plant Science**, v. 164, p. 833 839, 2003.
- BALL, S.G.; MORELL, M.K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 54, p. 207-233, 2003.
- BEECHING, J. R., et al. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava germplasm using molecular markers. **Annals of Botany**, v. 72, p. 515-520, 1993.
- BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- BERNFELD, P. Enzymes in carbohydrate metabolism. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1955. v. 1, p.149-150.
- BOOTH, R.H. Storage of fresh cassava (*Manihot esculenta*). I. Post Harvest deterioration and its control. **Experimental Agriculture**, v. 12, p. 103-111, 1976.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 4. ed, Natal: Editora Universitária da UFRN, p. 343-346, 1985.
- BREUNINGER, W. F.; PIYACHOMKWAN, K.; SRIROTH, K. **Starch: chemistry and technology**. 3th ed. New York: Elsevier, 2009
- BUSCHMANN, H. et at. Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of cassava. **Annals of Botany**, v. 86, p. 1153-1160, 2000.
- BUSCONI, M. et al. DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. **Food Chemistry**, v. 83, p. 127-134, 2003.

- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. <u>Clinical Chemistry</u> v. 55, p. 611-622, 2009.
- BRUCHMANN, E. Bioquímica técnica. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.
- CHOMCZYNSKY, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.
- CORRADINI, E. et al. Estudo comparativo de amido termoplástico derivado do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.
- COSTA, M. L. et al. The ceramic artifacts in archaeological black earth (terra preta) from lower Amazon Region, Brazil: Mineralogy. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 165-176, 2004.
- DANTAS, B.F. et al. Padronização da metodologia do RT-PCR utilizado para identificação do mRNA da α-amilase em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 2, 2002.
- DAVIES, H. Carbohydrate metabolism during sprouting. **American Potato Journal**, v. 67, p. 815-827, 1990.
- DELLAPORTA. S., WOOD, J., HICKS, J.B. A plant DNA mini preparation: Version II.

 Plant Molecular Biology Reporter, v. 1, p. 19-21, 1983.
- DEMIRKAN, E. S. et al. α-Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli.* **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2629–2636, 2005.
- DIJKSHOORN, L., TOWNER, K. J., & STRUELENS, M. New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data. New York: Elsevier, 2001.

- EL-SHARKAWY, M. A. Cassava biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 481-501, 2004.
- EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M. et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology,** v. 8, p. 131, 2008.
- FARALDO, M. I. F. et al . Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 57, n. 3,set. 2000 . Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-9016200000300020&lng=pt&nrm=iso. Acesso em 15 fev. 2011. doi: 10.1590/S0103-90162000000300020.
- FAUQUET, C.M.; TAYLOR, N. The potential for biotechnology to improve the nutritional value of cassava. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 23, n. 4, p. 364-366, 2004.
- FERREIRA, E. M.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220p, 1998.
- FINCHER, G.B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 305-346, 1989.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **The world cassava economy.**Disponível em: ">http://www.fao.org/docrep/009/x4007e/X4007E00.htm#TOC>.
 Acesso em: 04 aug. 2010a.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **FAOSTAT**. Disponível em: http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor.

 Acesso em: 04 aug. 2010b.
- FRANCO, C. M. L. et al. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas.** São Paulo: Fundação Cargill, 2002.

- GIMÉNEZ, M. J. et al. Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. **Food Chemistry**, v. 109, p. 638-646, 2009.
- GONZÁLEZ, C. F.; FARIÑA, J. I.; FIGUEROA, L. I. C. A critical assessment of a viscometric assay for measuring Saccharomyces fibuligera a-amylase activity on gelatinised cassava starch. **Enzyme and microbial technology**, v. 30, p. 169-175, 2002.
- GOSTIMSKY; KOKAEVA; KONOVALOV, Studying plant genome variation using molecular markers. **Russian Journal of Genetics**, v. 41, n. 4, p. 378-388, 2005.
- GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; MIR, R. R. <u>Array-based high-throughput DNA markers</u> for crop improvement. **Heredity**, n. 101, p. 5-18, 2008
- GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Reviews in Food Science** and **Nutrition**, v. 35, p. 373-403, 1995.
- HAGENIMANA, V.; VEZINA, L.P.; SIMARD, R.E. Sweet potato α- and β-amylases: characterization and kinectic studies with endogenous inhibitors. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 373-377, 1994.
- HUNT, G. J.; JUNIOR P. R. E. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. **Theory. Applied Genetic,** v. 85, p.15-20, 1992.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/Ispa/Ispa_2_01006_4.sh tm>. Acesso em: 04 ago. 2010.

- JAIN, M. et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. <u>Biochemical and Biophysical Research Communications</u>, v. 345, n. 2, p. 646-651, 2006.
- JAMES, M. G., DENYER, K., MYERS, A. M. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 6, p. 215–222, 2003.
- JANSSON, C. et al. Cassava, a potential biofuel crop in the people's Republic of China. **Applied Energy**, v. 86, p. S95-S99, 2009.
- KANEKO, M. et al. The alpha-amylase induction in enodsperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. **Plant Physiology**, v. 128, p. 1264-1270, 2002.
- LIN, K. H. et al. Genetic variation and its relationship to root weight in the sweet potato as reveled by RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p. 2-7, 2009.
- MACRAE, R. Food Science and technology A series of monoghraphys: **HPLC in food analysis**. 2 ed. New York: Academic Press, 1998. p.77.
- MAIA, S. H.Z.; MANGOLIN, C. A.; COLLET, S. A. O.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic diversity in somatic mutants of grape (*Vitis vinifera*) cultivar Italia based on random amplified polymorphic DNA. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, n. 1, p. 28-38, 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of redulcing sugar. **Analyzes Chemical**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MUKERJEA, R.; Y. U.; L. L.; ROBYT, J. F. Starch biosynthesis: mechanism for the elongation of starch chains. **Carbohydr. Res**. v. 337, n. 11, p.1015-1022, 2002.
- MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 319-328, 2000.

- MYERS, A. M. et al. Recent progress towards understanding biosyntesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v. 122, p. 989-997, 2000.
- NEI, M.; LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 76, p. 5269-5273, 1979.
- NEPA-UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.** Versão II, 2. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.
- NIELSEN, V. A.; CHRISTENSEN, E. I. M. T.; BOIJO, M.; MARCUSSEN, J. Purification and characterization of b-amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 190-196, 1997.
- NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. **Enzyme and Microbial Technology**. v.17, Sep 1995. p. 770-778.
- NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G. Three a-amylases from malted finger millet purification and partial characterization. **Phytochemistry**, v. 62, p. 21-30, 2003.
- OLIVEIRA, E. M. M. et al. Use of cassava residues for alchool production. In: SIMPÓSIO SOBRE INOVAÇÃO E CRIATIVIDADE CIENTÍFICA DA EMBRAPA. 2008, Brasília. **Anais eletrônicos...** Brasília: EMBRAPA, 2008. Disponível em: http://www.embrapa.br/eu_quero/inovaecria/comunicacoes/101_etanolresidu_osmandioca_ednaoliveira_ctaa_0822_1753.pdf>. Acesso em: 14 aug. 2010.
- PADMAJA, G.; BALAGOPAL, C. Cellular and extracellular enzymes associated with the post harvest deterioration of cassava tubers. **Journal of Food Science and Technology**, v. 22, p. 82-87, 1985.
- PASCOAL, A. et al. Survey of the authenticity of prawn and shrimp species in commercial food products by PCR-RFLP analysis of a 16S rRNA/tRNA mitochondrial region. **Food Chemistry**, v. 109, p. 638-646, 2008.

- PASCUAL, C. S. C. I. Parâmetros físico-químicos e purificação de enzimas amilolíticas da mandioca (Manihot esculenta Crantz cv. Zolhudinha). São Paulo, 2005 (Dissertação de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP).
- PERONI, N.; MARTINS, S.; AKIHIKO ANDO, A. Diversidade inter- e intra-específica e uso de análise multivariada para morfologia da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): um estudo de caso. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 3, 1999.
- PIRES, T.C.R.; VEIGA, E.M.; FINARDI FILHO, F. Enzimas amilolíticas de mancioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Brancroft.). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n. 3, p.278-284, 2002.
- PINHATI, F. R. Caracterização molecular da população microbiana do lodo de refinaria de petróleo por PCR-DGGE e RAPD. Rio de Janeiro, 2008 (Dissertação de mestrado Instituto de Química UFRJ).
- PULIDO, R. P. et al. Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. **Applied and Environmental Microbiology**, 71, 7872-7879, 2005.
- PUONTI-KAERLAS, J. Cassava biotechnology. **Biotechnology and genetic** engineering reviews, v. 15, p. 278-284, 1998.
- RAMOS, J. R. et al. Optimizing reproducibility evaluation from random amplified polymorphic DNA markers. Genetics and Molecular Research, 7, 1384-1391, 2008.
- RONDÁN-SANABRIA, G.G.; PIRES, T.C.R.; FINARDI FILHO, F. Preliminary approach to detect amylolytic and pectinolytic activities from maca (*Lepidium meyenii* Walp.). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 42, n. 1, 1-10, 2006.
- ROSS, H. A.; DAVIES, H. V. Amylase activity in potato tubers. **Potato Research,** v. 30, p. 675-678, 1987

- RUBIO-MORAGA, A. et al. Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. <u>BMC Research Notes, v. 2</u>, p. 189, 2009.
- SAITO, K; HIRAI, M. Y.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K. Decoding genes with coexpression networks and metabolomics. **Trends Plant Sci**, n. 13, v. 1, p. 36-43, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning a laboratory manual.** Nova York: CSHL Press. 2001. v. 1.
- SCHILLINGER, U. et al. Use of group-specific and RAPD-PCR analyses for rapid differentiation of Lactobacillus strains from probiotic yogurts. **Current Microbiology**, v. 47, p. 453-456, 2003.
- SEWARD, R. J. et al. Direct comparison of two commercially available computer programs for analyzing DNA fingerprint gels. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, p. 314-320, 1997.
- SIJU, S.; MADHUBALA, R.; BHAT, A. I. Sodium sulphite enhaces RNA isolation and sensivity of Cucumber mosaic virus detection by RT-PCR in black pepper.

 Journal of Virological Methods, v. 141, p.107-110, 2007.
- SILVA, R. M. et al. Biologia reprodutiva de etnovariedades de mandioca. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 58, n. 1, mar. 2001. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-9016200100016&lng=pt&nrm=iso. Acesso em 15 fev. 2011. Doi: 10.1590/S0103-90162001000100016.
- SILVEIRA, I. A.; OLIVEIRA, R. M.; CARVALHO, E. P.; CARVALHO, D.; PILON, L. Aspectos gerais, positivos e negativos da utilização de marcadores PCR-RAPD na identificação de microrganismos. **Boletim SBCTA**, v.34, n.2, p.77-83, 2000.
- SHILLS, M. E. et al. **Modern nutrition in health and disease**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

- SMITH, A.; ZEEMAN, S. C.; SMITH, C. Starch degradation. **Annual Review Plant Biology,** v. 56, p. 73-98, 2005.
- SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Estrutura dos grânulos de amido. In: FRANCO, C. M. L. et al. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas.** São Paulo: Fundação Cargill, 2002.
- TANGPHATSORNRUANG, S. et al. Isolation and characterization of an alphaamylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 821-827, 2005.
- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Review. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.
- VAN HUNG, P.; MAEDA, T.; MORITA, N. Waxy and high-amylose wheat starches and flours: characteristics, funcionality and application. **Trens in Food Science & Technology**, v. 17, p.448-456, 2006.
- VEIGA, E. M. Caracterização e purificação parcial de alfa amilase de mandioca (Manihot esculenta Crantz). São Paulo, 2002. (Dissertação de Mestrado Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP).
- VRINTEN, P.L.; NAKAMURA, T. Wheat Granule-Bound Starch Synthase I and II Are Encoded by Separate Genes That Are Expressed in Different Tissues. **Plant Physiology,** v. 122, p. 255–263, 2000.
- WANG, T. L.; BOGRACHEVA, T. Y.; HEDLEY, C. L. Starch: as simple as A, B, C? **Journal of Experimental Botany,** v. 49, n. 320, p. 481-502, 1998.
- WELSH, J.; MCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n° 24, p. 7213-7218, 1990.
- WENHAM, J. E. Post-harvest deterioration of cassava: A biotechnology perspective. Disponível em: httm#Contents. Acesso em: 04 aug. 2010.

- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K..; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markes. **Methods in Enzymology**, v.218, p.704-740, 1993.
- WONG, H.; YEOH, H.; LIM, S. Customisation of AFLP analysis for cassava varietal identification. **Phytochemistry**, v. 49, p. 808-813, 1999.
- WONG, H. et al. Design of primers for RAPD analyses of cassava, Manihot esculenta. **Phytochemistry**, *v.* 46, p. 805-810, 1997.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos TBCAUSP**. Disponível em http://www.fcf.usp.br/tabela/
 Acesso em 14 ago. 2010.
- YAMAMOTO, T. Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes. Tokyo: CRC Press, 1994.
- YAMAUCHI, D.; TAKEUCHI, H.; MNAMIKAWA, T. Structure and expression of a α-amilase gene from vigna mungo. **Plant Cell Physiology,** v. 35, p. 705-711, 1994.
- ZHOU, X. & JIAO, X. Investigation of *Listeria monocytogenes* contamination pattern in local Chinese food market and the tracing of two clinical isolates by RAPD analysis. **Food Microbiology**, v.21, p.695-702, 2004.

Anexo 1

Protocolo DNeasy®

A extração do DNA foi realizada de acordo com as instruções do kit. Trata-se de uma resina de sílica ligante de DNA que se baseia nas seguintes etapas:

- precipitação de agentes inibidores seguida de remoção dos mesmos com a coluna QIAshredder;
- ligação do DNA à coluna DNeasy Spin, na presença de agentes caotrópicos (guanidina-hidroclorida);
- eluição de contaminantes com isopropanol;
- recuperação do DNA através de eluição em tampão com baixa concentração de sais.

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se o kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Uma alíquota de 100 mg de folha foi incubada com 40 μL de solução de proteinase K 20mg/mL, após homogeneização em agitador. Após o período de incubação de 3 horas a 55°C, foi realizada a lise e precipitação de contaminates presentes na matriz alimentar segundo o protocolo do kit DNeasy. O DNA foi recuperado através da utilização da coluna DNeasy (Qiagen), contendo silica ligante de DNA.

Protocolo Dellaporta modificado

Uma alíquota de 50 mg amostra foi transferida para um tubo de reação de 1,5mL esterilizado, onde foi adicionado 1 mL de tampão EB (Tris 100mM pH8, EDTA 50mM pH8, NaCl 500mM, mercaptoetanol 10mM) e 300 µL de SDS 20%. O tubo foi submetido a vórtex, com posterior incubação a 65°C por 10 minutos. Em sequência, foi adicionado 300 µL de acetato de potássio 3M, vórtex, e a mistura foi incubada a 0°C por 20 minutos. Após transcorrido o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 20 minutos. Uma alíquota de 600 µL de sobrenadante foi retirada e transferida para um tubo contendo 600 µL de isopropanol, e incubada a -20°C por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm a 4°C por 15 min, com posterior descarte do sobrenadante, e invertidos sobre papel absorvente para secagem do precipitado remanescente nos mesmos. O DNA foi ressuspenso em 700 µL de TE (Tris 50mM, EDTA 10mM pH 8,0), e os tubos foram centrifugados a 13000 por 10 minutos. Todo o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, acrescido de 75 µL de acetato de sódio 3M e 500 µL de isopropanol. A mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, com posterior centrifugação por 5 minutos, e descarte do sobrenadante. Um mililitro de etanol 70% a 4°C foi adicionado ao tubo, que foi centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos, com descarte do sobrenadante. Os tubos foram deixados na posição invertida sobre papel absorvente, a fim de secar os pellets, ressuspensos em 50 µL de água MilliQ.