

## **ESTRUTURA GENÉTICA ENTRE ETNOVARIEDADES DE MANDIOCA DOCE CULTIVADAS EM ROÇAS DE AGRICULTORES FAMILIARES NO MUNICÍPIO DE ALTA FLORESTA MATO GROSSO, BRASIL**

**Autor(a):** AUANA VICENTE TIAGO<sup>1</sup>

**Coautores(as):** VINICIUS DELGADO DA ROCHA, FERNANDO SARAGOSA ROSSI, EULALIA SOLER SOBREIRA HOOGERHEIDE<sup>3</sup>

**Instituição:** Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT

**Orientador(a):** ANA APARECIDA BANDINI ROSSI.<sup>2</sup>

**Colaboradores(as):** JOYCE MENDES ANDRADE PINTO

auana\_bio@hotmail.com<sup>1</sup>

anabanrossi@gmail.com<sup>2</sup> viniciusdelgado123@hotmail.com, fernandosarossi@gmail.com, eulalia.hoogerheide@embrapa.br<sup>3</sup>

Os marcadores genéticos tem aplicação importante na caracterização da diversidade dos recursos genéticos, pois permitem quantificar a diversidade genética, estimar a endogamia, caracterizar novas espécies e avaliar o histórico de dispersão. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar a estrutura genética entre 29 etnovariedades de mandioca cultivadas no município de Alta Floresta, MT, por meio de marcadores microssatélites. Um total de 29 genótipos de etnovariedades de mandioca foi coletada e levada ao Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular de Plantas do Campus Universitário da UNEMAT de Alta Floresta-MT. A extração do DNA seguiu protocolo de CTAB. As reações de amplificação foram realizadas isoladamente para cada um dos 15 primers SSR marcado com as fluorescências. Os dados obtidos foram analisados pelo programa Structure e GenAIEx. O número mais provável de grupos que contribuíram para a composição genética dos cultivos de mandioca foi verificado pelo  $\Delta K$ , indicando a formação de dois grupos genéticos distintos entre as amostras avaliadas. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que os grupos obtidos com a análise do Structure (K1 e K2) diferiram significativamente entre si, com 99% de variação dentro dos grupos, considerado valor expressivo, confirmando a presença de diversidade genética entre os genótipos de mandioca. A baixa variação entre os grupos (1%) também pode ser confirmada pelo  $F_{st}$ , com valor de 0.009. Os resultados do estudo revelou que as etnovariedades de mandioca cultivadas nas roças do município de Alta Floresta, MT, apresentam uma estrutura genética, indicando que as roças dos agricultores familiares são mantedoras de diversidade genética para espécie.

**Palavras-chave:** Manihot esculenta; Recursos Genéticos; Marcadores Microssatélites

## INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euphorbiaceae, sendo a única espécie cultivada dentro do gênero *Manihot* com 98 espécies já identificada, incluindo como centro de domesticação as regiões de Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Acre (NASSAR et al., 2008; OLSEN & SCHAAL, 1999; ALLEN, 1987).

O número de variedades com diferentes características morfológicas, é dada pela sua heterozigosidade, favorecida pelos cruzamentos naturais intra-específicos e propagação vegetativa (LORENZI, 2003). Pela significativa diversidade que se encontra neste sistema de cultivo, diversos trabalhos têm sido realizados, apresentando resultados com valores consideráveis de diversidade genética (GONÇALVES et al., 2017; SOUZA SILVA et al., 2016; COSTA et al., 2013).

Os marcadores genéticos tem aplicação importante na caracterização da diversidade dos recursos genéticos, pois permitem quantificar a diversidade genética, estimar a endogamia, caracterizar novas espécies e avaliar o histórico de dispersão (FREELAND, 2005). Podemos assim, destacar os marcadores microssatélites, que são densamente encontrados nos genomas dos eucariotos, os quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, além de sua natureza codominante, que permite a separação de indivíduos homozigotos de heterozigotos (BORÉM et al., 2016).

Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar a estrutura genética entre 29 etnovariedades de mandioca cultivadas no município de Alta Floresta, MT, por meio de marcadores microssatélites.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho constituiu de visitas a campo nas propriedades rurais do município de Alta Floresta, MT, para um levantamento das etnovariedades de mandioca que os agricultores cultivavam. Assim, selecionou-se o maior número possível de etnovariedades, desconsiderando os genótipos denominados pelo mesmo nome, ou seja, as etnovariedades duplicadas. Um total de 29 genótipos de etnovariedades de mandioca foi coletada e levada ao Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular de Plantas do Campus Universitário da UNEMAT de Alta Floresta-MT.

A extração do DNA seguiu protocolo de CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) descrito por DOYLE & DOYLE (1990), com modificações. A verificação do DNA extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com gel Red e diluídos a uma concentração de 100 ng/μL utilizando de um Nanodrop 2000.

As reações de amplificação foram realizadas isoladamente para cada um dos 15 *primers* SSR (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 1998; MBA et al., 2001), marcado com as

fluorescências 6-FAM e HEX, em um volume final de 10  $\mu$ L. Em seguida as amostras foram colocadas em placas, identificadas e enviadas ao Centro de Estudo do Genoma Humano e Células Tronco, Universidade de São Paulo (USP). As genotipagens dos microssatélites foram realizadas em eletroforese capilar no Analisador Automático de DNA ABI 3130XL *Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)*.

Posteriormente, o tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com um DNA de tamanho conhecido Rox 500 (APPLIED BIOSYSTEMS) utilizando o programa GeneMarker (v. 2. 6. 3).

O programa “Structure” versão 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), baseado no modelo de agrupamento Bayesiano, foi utilizado para inferir número de grupos (K), usando Markov chain Monte Carlo (MCMC). Para determinar o melhor K encontrado na população utilizou-se do arquivo de saída do “Structure” baseado no STRUCTURE HARVEST (EARL & VONHOLDT, 2012) determinado pelo  $\Delta K$ .

Com os dados particionados em dois grupos (K=2), obtidos pelo programa Structure, foi possível realizar uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) para revelar a distribuição da diversidade genética dentro e entre os genótipos de etnovariedades de mandioca, para tanto, utilizou-se o programa GenAIEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O número mais provável de grupos que contribuíram para a composição genética dos cultivos de mandioca foi verificado pelo  $\Delta K$ , indicando a formação de dois grupos genéticos distintos entre as amostras avaliadas (Figura 1). No eixo das ordenadas do gráfico encontram-se as probabilidades das etnovariedades pertencerem ao k-ésimo grupo e no eixo das abscissas estão identificadas a sigla de cada genótipo. O grupo I constituiu-se de dezoito etnovariedades e o grupo II foi composto de onze. Gonçalves et al. (2017) estudando a diversidade genética de cinquenta e um acessos tradicionais de mandioca doce em quatro município do estado de Minas Gerais, revelou a formação de quatro grupos distinto de acordo com o delta K, sendo observada mistura entre as quatro subpopulações formadas. Assim como também constatado neste estudo, onde o grupo verde teve uma mistura do grupo vermelho e vice-versa. Apesar de todos os 29 genótipos terem sido coletados no município de Alta Floresta, quatro amostras têm como procedência o município de Carlinda-MT (CAMAII14) e os estados do Paraná (PRMAIII16) e da Bahia (BAAB18 e BAMBPB27), tendo estas ficado dividido em ambos os grupos formados juntamente com as demais etnovariedades de Alta Floresta.

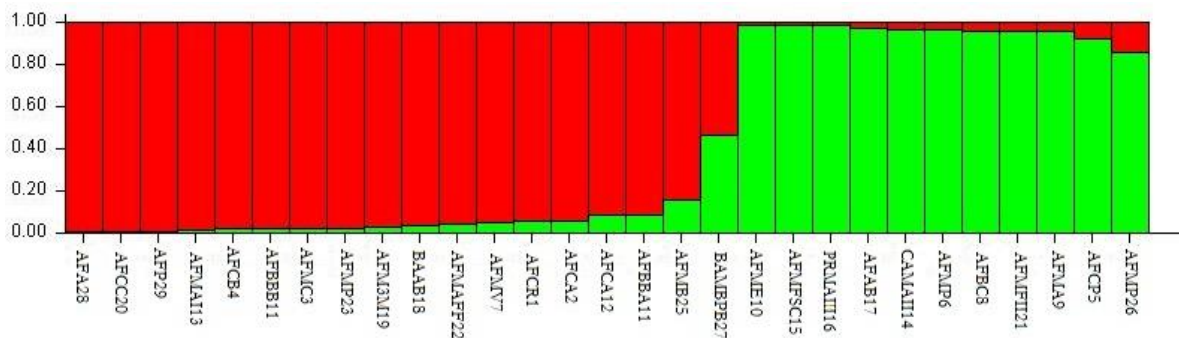


Figura 1. Agrupamento dos 29 genótipos de etnovarietades de mandioca obtidos através do programa “Structure” utilizando 15 *primers* SSR, assumindo K=2 (grupos).

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que os grupos obtidos com a análise do Structure (K1 e K2) diferiram significativamente entre si, com 99% de variação dentro dos grupos, considerado valor expressivo, confirmando a presença de diversidade genética entre os genótipos de mandioca avaliados (Tabela 2). Costa et al. (2013), avaliando a diversidade genética e estrutura populacional de mandioca doce encontrou valor de 77% de variação dentro dos grupos. A baixa variação entre os grupos (1%) também pode ser confirmada pelo *Fst*, que estima a diferenciação genética entre os grupos (WRIGHT, 1978). Neste estudo o valor de *Fst* foi de 0.009, que de acordo com a classificação de Hartl & Clarck (2010) é considerada como pequena diferenciação genética.

Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) entre os 29 genótipos de etnovarietades de mandioca divididos em duas populações de acordo com o resultado obtido pelo programa “Structure”.

Fonte de Variação	GL <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	CV <sup>3</sup>	VT (%) <sup>4</sup>	Valor de P <sup>5</sup>	Fst <sup>6</sup>
Entre grupos	1	22.315	0.183	1%	<0.098	0.009
Dentro de grupos	27	532.858	19.735	99%		
Total	28	555.172	19.919	100%		

<sup>1</sup>GL, grau de liberdade; <sup>2</sup>SQ, soma dos quadrados; <sup>3</sup>CV, componentes de variância; <sup>4</sup>VT, variância total; <sup>5</sup>P, probabilidade de significância e <sup>6</sup>Fst, índice de fixação entre populações.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo revelam que as etnovarietades de mandioca cultivadas nas roças do município de Alta Floresta, MT, apresentam uma estrutura genética formando dois grupos genéticos. As etnovarietades de mandioca possuem variabilidade genética intragrupos, indicando que as roças dos agricultores familiares são mantedoras de diversidade genética para espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, A.C. *Manihot esculenta* as a native of the neotropics. **Plant Genetic Resources**, v. 71, p. 22-24, 1987.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2016. 385 p.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. P.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; FREGENE, M. A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 3, p. 493-501, 1998.
- COSTA, T.R.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; GALVÁN, M. Z.; LACANALLO, G. F.; SILVA, L. I.; KVITSCHAL, M. V. Genetic diversity and population structure of sweet cassava using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 10, 2013.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- EARL, D.A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetic Resources**, v.4, p.359–361, 2012.
- FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2005. 400 p.
- GONÇALVES, T.M.; VIDIGAL FILHO, P.S.; VIDIGAL, M. C. G., FERREIRA, R.C.U.; ROCHA, V.P.C.; ORTIZ, A.H. T.; KVITSCHAL, M.V. Genetic diversity and population structure of traditional sweet cassava accessions from Southern of Minas Gerais State, Brazil, using microsatellite markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 346, 2017.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.
- LORENZI, J. O. **Mandioca**. CATI: Campinas, 2003. 116 p.
- MBA, R. E. C.; STEPHENSON, P.; EDWARDS, K.; MELZER, S.; NKUMBIRA, J.; GULLBERG, U.; APEL, M.; GALE, J.; TOHME, M.; FREGENE, M. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 1, p. 21-31, 2001.
- NASSAR, N.M.A.; HASHIMOTO, D.Y.C.; FERNANDES, S.D.C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 16-28, 2008.
- OLSEN, K.M.; SCHAAL, B.A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Evolution**, v. 96, p. 5586-5591, 1999.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**.28: 2537- 2539, 2012.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/genetics/155/2/945.full.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2017.
- SOUZA SILVA, R.; MOURA, E. F.; FARIAS NETO, J. T., SOUSA, N. R.; MOURA, M. F.; SAMPAIO, J. E. Genetic divergence among accessions of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) sampled in the Tapajós region, State of Pará, using agronomic characters and microsatellite markers. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 2989-3004, 2016.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Chicago: University of Chicago, 1978. 590 p.