

VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE MANDIOCA AÇUCARADOS E NÃO AÇUCARADOS ACESSADA POR MEIO DE MARCADORES RAPD

Graciele Bellon¹, Eduardo Alano Vieira¹, Fábio Gelape Faleiro¹, Kenia Graciele da Fonseca¹, Josefino de Freitas Fialho¹, Mário Ozeas Sampaio dos Santos Filho¹ (¹*Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina, DF.*

E-mail: (bellon@cpac.embrapa.br, vieiraea@cpac.embrapa.br)

Termos para indexação: *Manihot esculenta* Crantz, variabilidade genética, marcadores moleculares, mandiocas açucaradas, melhoramento genético.

Introdução

A Embrapa Cerrados coordena o Banco Regional de Germoplasma de Mandioca do Cerrado (BGM-C), que reúne cerca de 500 acessos e tem por objetivo conservar a variabilidade genética de mandioca presente na região do Cerrado Brasileiro. E assim servir como fonte de genes para programas de melhoramento genético voltados às demandas da região. Dentre os acessos mantidos no BGM-C se destacam os acessos que não armazenam amidos em suas raízes de reserva (como usualmente ocorre na cultura da mandioca) e sim açúcares livres e que foram primeiramente estudados por Carvalho et al. (2000) e Carvalho et al. (2004).

Esses genótipos conhecidos como mandiocas açucaradas ou mandiocabas evidenciam potencial de uso no futuro na indústria na produção de xarope de glicose sem a necessidade da hidrólise do amido, na produção de amido com variabilidade na proporção amilose/amilopectina, na produção de amido do tipo glicogênio, na produção de amido do tipo “waxy”, na produção de bebidas fermentadas, na produção de álcool para indústria de cosméticos, na utilização de amidos específicos na indústria siderúrgica, na produção de álcool combustível; entre outras utilidades (Carvalho et al., 2000; Carvalho, 2005). Entretanto esses acessos ainda não foram suficientemente estudados quanto a sua variabilidade genética, o que é fundamental para a conservação desses acessos e sua utilização no melhoramento genético.

O objetivo do trabalho foi determinar a variabilidade genética entre variedades de mandioca açucaradas e não açucaradas por meio de marcadores RAPD.

Material e Métodos

Foram analisados 14 acessos de mandioca mantidos no Banco Regional de Germoplasma de Mandioca do Cerrado (BGMC), sendo 10 acessos açucarados, dois acessos locais introduzidos no BGMC como açucarados e duas variedades melhoradas recomendados para o cultivo na região do Cerrado (uma de mesa e uma de indústria), listados na Tabela 1.

A DNA dos acessos foi extraído a partir de folhas em estágio intermediário de maturação, por meio do método do CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003), otimizado e validado (Bellon et al., 2007). As amostras de DNA de cada acesso foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 13 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um *primer* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 12 *primers* decâmeros: OPD (02, 08, 18), OPF (08), OPG (05, 08, 09, 15 e 16), OPH (10, 16 e 17). Foi utilizado um termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 90 segundos a 72°C. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de seis minutos a 72°C, e posteriormente, a temperatura foi reduzida para 4°C. Após a amplificação, foram adicionadas, a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Acessos de mandioca açucarados e não açucarados analisados e seus respectivos nomes comuns.

Acessos	Nome comum	Tipo
BGMC 1208	Sem denominação	local não açucarado
BGMC 1210	Sem denominação	local não açucarado
BGMC 1212	Sem denominação	açucarado
BGMC 1213	Sem denominação	açucarado

BGMC 1211	Sem denominação	açucarado
BGMC 1217	Iguaçu	açucarado
BGMC 1215	Castanhau	açucarado
BGMC 1207	Sem denominação	açucarado
BGMC 1209	Sem denominação	açucarado
BGMC 1214	Sem denominação	açucarado
BGMC 1219	São Francisco 1	açucarado
BGMC 1220	São Francisco 2	açucarado
BGMC 753	IAC 12 (Mandioca de indústria)	melhorado não açúcarado
BGMC 436	IAC 756-70 (Mandioca de mesa)	melhorado não açúcarado

Os produtos das reações de amplificação (marcadores RAPD), foram classificados conforme presença (1) e ausência (0) e convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foi estimada a similaridade genética entre os diferentes genótipos, com base no coeficiente de similaridade de Jaccard. Com base na matriz de similaridade foi construído um dendrograma por meio do método de agrupamento da distância média (UPGMA). Para a verificação do ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal e Rohlf (1962), todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000).

Resultados e Discussão

Os 12 *primers* utilizados geraram um total de 131 marcadores RAPD, dos quais 96 (73%) foram polimórficos, evidenciando a existência de variabilidade genética e a eficiência da técnica de RAPD na detecção da variabilidade genética presente nos genótipos estudados. A elevada eficiência da técnica de RAPD na detecção de variabilidade genética entre acessos de mandioca já havia sido relatada por Zacarias et al., (2004); Asante e Offei, (2003). Dentre as bandas polimórficas, duas foram detectadas em todos os acessos não açúcarados e em nenhum açúcarado (nos *primers* OPH-10 e OPH-17), enquanto que uma banda foi detectada em todos os acessos açúcarados e em nenhum dos não açúcarados (no iniciador OPF-8). Estas bandas podem constituir marcadores com grande potencial para a diferenciação dos genótipos quanto à presença ou ausência do fenótipo açúcarado nas raízes. Além disso, podem vir a ser importantes no mapeamento genético, para a detecção de associação entre marcadores e locos controladores do caráter. Portanto, estas devem ser priorizadas quando do mapeamento

genético, uma vez que existem evidências de que elas podem estar pelo menos parcialmente associadas ao caráter. Dentre os *primers* utilizados o que evidenciou o maior número de bandas polimórficas foi o OPG-08 com 12 bandas e o que evidenciou o menor número de bandas polimórficas foi o primer OPH-10 com 03 bandas polimórficas (Tabela 2).

A similaridade genética estimada evidenciou que os acessos mais similares foram BGMC 1207 e BGMC 1209 ambos açúcarados e que os menos similares foram o acesso açúcarado BGMC 1219 e a variedade melhorada de mandioca de indústria recomendada para o plantio na região do cerrado BGMC 436. A análise da Figura 1 permitiu claramente a partição dos acessos avaliados em 4 grupos: grupo i) formado pelos 10 acessos açúcarados (BGMC 1212, BGMC 1213, BGMC 1211, BGMC 1217, BGMC 1215, BGMC 1207, BGMC 1209, BGMC 1214, BGMC 1219 e BGMC 1220); grupo ii) formado pelos acessos locais (BGMC 1208 e BGMC 1210), que foram introduzidos no BGMC como açúcarados, mas que não evidenciaram o fenótipo nas condições do Cerrado; grupo iii) formado pelo acesso BGMC 753; e grupo iv) formado pelo acesso BGMC 436 (Figura 1).

Tabela 2. *Primers* utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivo número de bandas polimórficas e monomórficas.

Primer	Sequência 5'→3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-02	GGACCCAACC	5	0
OPD-08	GTGTGCCCCA	9	4
OPD-18	GAGAGCCAAC	9	9
OPF-08	GGGATATCGG	11	2
OPG-05	CTGAGACGGA	10	4
OPG-08	TCACGTCCAC	12	0
OPG-09	CTGACGTCAC	9	1
OPG-15	ACTGGGACTC	5	2
OPG-16	AGCGTCCTCC	5	4
OPH-10	CCTACGTCAG	3	3
OPH-16	TCTCAGCTGG	10	3
OPH-17	CACTCTCCTC	8	3
TOTAL		96	35

Os resultados obtidos revelaram a existência de variabilidade genética em nível de DNA entre os acessos açúcarados uma vez que não foi detectada nenhuma similaridade de

100% o que é importante para o melhoramento genético que é dependente de variabilidade. Além disso, a técnica de RAPD se mostrou eficiente na discriminação dos acessos em função do fenótipo açúcares nas raízes, uma vez que nenhum acesso não açúcarado agrupou-se com acessos açúcarados. Fato interessante foi que os acessos BGMC 1208 e BGMC 1210 que haviam sido introduzidos no BGMC como açúcarados e que somente após a coleta de amostras foliares para a execução desse trabalho foi detectado que nas condições do Cerrado não evidenciam o fenótipo açúcarado formaram um grupo isolado, o que revela que esses acessos apresentam um *background* genético diferente dos acessos açúcarados e das variedades recomendadas para o cultivo na região do Cerrado. O fato dos dois acessos oriundos de programas de melhoramento genético BGMC 753 e BGMC 436 terem evidenciado elevada divergência genética em relação aos demais acessos analisados (açúcarados e genótipos locais não açúcarados) revela que o processo de seleção artificial realizado pelos melhoristas nas estações de pesquisa redundou em ampla variação genética. O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma ($r = 0,99$) revelou elevado ajuste entre a representação gráfica da similaridade genética e a matriz de similaridade original, o que justifica que sejam realizadas inferências por meio da avaliação visual da Figura 1.

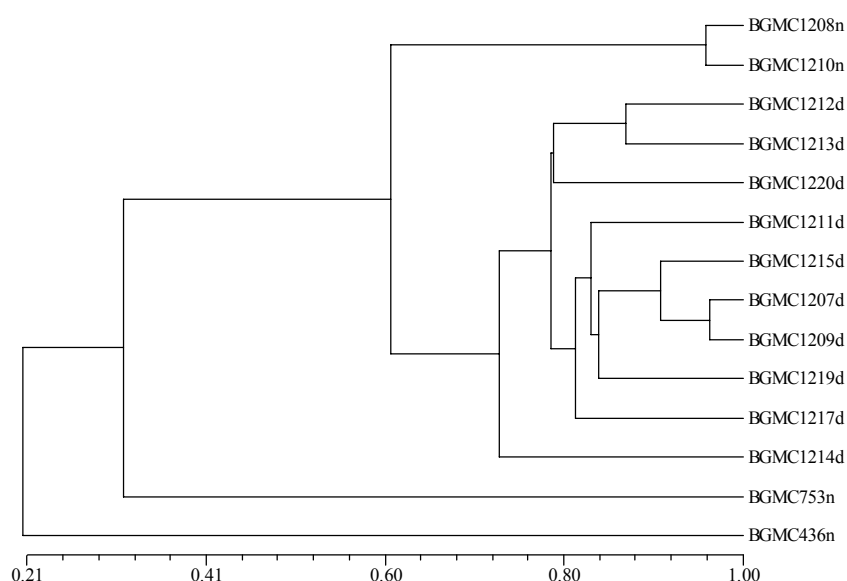


Figura 1. Dendrograma resultante da análise de 14 acessos de mandioca, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de similaridade genética obtida por meio do

coeficiente de Jaccard utilizando-se 131 marcadores RAPD. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,99.

Conclusões

Os marcadores RAPD mostraram eficiência na determinação da variabilidade genética entre acessos de mandioca açúcarados e não açúcarados e diferenciaram claramente os acessos açúcarados dos locais não açúcarados e dos acessos melhorados.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa, Fundação Banco do Brasil, CNPq, FAPDF e ao Programa Biodiversidade Brasil-Itália pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

ASANTE, I.K.; OFFEI, S.K. RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. **Euphytica**, v.131, p.113-119, 2003.

BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; FERREIRA, C.F.; KARIA, C.T. ; FONSECA, K.G.; SANTOS, E. C.; SANTOS, J.R.P.; TEIXEIRA, M.A; JUNQUEIRA, K. P. Validação e otimização de protocolo simplificado para extração de DNA a partir de tecido foliar. **In:** 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2007, São Lourenço- MG. 2007.

CARVALHO, L.J.C.B. Biodiversidade e biotecnologia em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **In:** CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, XI, 2005, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005.

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

CARVALHO, L.J.C.B.; CABRAL, G.B.; CAMPOS, L. **Raiz de reserva de mandioca: um sistema biológico de múltipla utilidade**. Brasília: CENARGEN, 2000. 16p.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado**. Planaltina: CPAC, 2003. 6p.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software, 2000. 98p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p.30-40, 1962.

ZACARIAS, A.M.; BOTHA, A.M.; LABUSCHAGNE, M.T.; BENESI, I.R.M. Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm from Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica**, v.138, p.49-53, 2004.