



## DADOS MOLECULARES FORNECEM NOVOS INSIGHTS EM *Manihot carthagenensis*

THAMYRES CARDOSO DA SILVEIRA<sup>1</sup>, MÁRCIO LACERDA LOPES MARTINS<sup>2</sup>, CARLOS ALBERTO DA SILVA LEDO<sup>3</sup>, ALFREDO AUGUSTO CUNHA ALVES<sup>4</sup>, LUIZ ORLANDO DE OLIVEIRA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Ph Rolfs s/n, Campus Universitário, Centro Viçosa-MG, E-mail: <sup>1</sup>tcssilveira@gmail.com,

<sup>2</sup>marciollm@ufrb.edu.br, <sup>3</sup>carlos.ledo@embrapa.br, <sup>4</sup>alfredoalves3@gmail.com,

<sup>5</sup>luiz.ufv@hotmail.com

Temática: Melhoramento genético e Biotecnologia

### Resumo

Três subespécies são reconhecidas em *Manihot carthagenensis*. *M. carthagenensis* subsp. *carthagenensis*, *M. carthagenensis* subsp. *glaziovii* e *M. carthagenensis* subsp. *hahnii*. Essas subespécies são diferenciadas principalmente com relação à distribuição geográfica e pela morfologia da folha e do fruto. Nesse trabalho, as relações entre espécies estreitamente relacionadas à *Manihot carthagenensis* e sua distinção em subespécies, foi investigada com base em sequências do terceiro ítron do gene nuclear redutase do nitrato (*NIA-i3*). Dez Sequências novas foram alinhadas com 35 sequências obtidas a partir do GenBank e uma análise bayesiana foi empregada. Os resultados a partir da árvore gerada mostrou que a distinção de subespécies em *M. carthagenensis* não foi apoiada nesse estudo. Dados moleculares também sugeriram *M. guaranitica* como sinônimo de *M. carthagenensis*, assim como proposto em estudos anteriores com base na morfologia. Além disso, a provável origem de *M. carthagenensis* no ambiente de Mata Seca também foi sugerido, embora maiores investigações sejam necessárias.

**Palavras Chave:** Filogenia molecular, redutase do nitrato, inferência bayesiana.

### Introdução

Espécies silvestres de *Manihot* são importantes reservatórios de alelos de interesse a serem transferidos para a espécie cultivada (Nassar 2006), entretanto, sua utilização ainda é limitada devido à falta de conhecimento sobre as mesmas, tanto sob o ponto de vista agronômico quanto sistemático (Nassar 2000).

O complexo *Manihot carthagensis* destaca-se por incluir espécies com características agronômicas de interesse e consideradas filogeneticamente próximas à *M. esculenta* (Allem et al. 2001). A taxonomia desse complexo envolve seis espécies que habitam preferencialmente regiões áridas. *Manihot carthagenensis* (Jacquin) Müll. Arg. e *M. filamentosa* Pittier ocorrem no norte da América do Sul e se diferenciam apenas pelo porte que apresentam e pelo comprimento dos filetes (Rogers e Appan 1973). *Manihot epruina* Müll. Arg., *M. glaziovii* Müll. Arg., *M. johannis* Müll. Arg. e *M. pseudoglaziovii* Müll. Arg. ocorrem no nordeste do Brasil e nordeste de Minas Gerais e são diferenciadas por caracteres como inserção do pecíolo e tamanho da inflorescência.

Allem (2001), baseado em um extenso conhecimento das populações naturais e na fragilidade dos caracteres usados para a distinção dessas espécies, sinonimizou todas as espécies à *M. carthagenensis* considerando três subespécies. *Manihot carthagenensis* subsp. *carthagenensis*, inclui as populações do norte da América do Sul e possui folhas com lobos pandurados, enquanto *M. carthagenensis* subsp. *glaziovii* (Müll. Arg.) Allem, inclui as populações do nordeste do Brasil, com folhas com lobos inteiros, e *M. carthagenensis* subsp. *hahnii* Allem inclui as populações com frutos costelados do noroeste de Minas Gerais.



Dados recentes, no entanto, evidenciaram uma extensa variação nesses caracteres, dentro das mesmas populações, sobretudo no que se refere à forma do lobos, tamanho das inflorescências e inserção do pecíolo (Neves et al. 2014). Esses resultados sugerem que a taxonomia de *Manihot carthagenensis* *sensu* Allem (2001) necessita de uma investigação a partir de dados que não se restrinjam a aspectos morfológicos e geográficos, e por isso, uma investigação baseada em dados moleculares pode ajudar a definir a importância dos traços morfológicos tradicionalmente usados na delimitação de *Manihot carthagenensis*.

O objetivo desse trabalho foi explorar as relações entre espécies estreitamente relacionadas à *Manihot carthagenensis* e testar se a distinção de subespécies nessa espécie é confirmada com base em sequências do terceiro ítron do gene nuclear redutase do nitrato (*NIA-i3*).

## Material e Métodos

A análise filogenética incluiu 45 sequências (dez originais e 35 obtidas pelo GenBank) a partir de 19 espécies de *Manihot*. Nesse estudo, foi adotada a classificação de Allem (2001) para *M. carthagenensis*. O DNA total de dez indivíduos foi extraído segundo o protocolo de Cota-Sánchez et. al. (2006) com as modificações de Riahi et al. (2010). O terceiro ítron do gene redutase do nitrato foi amplificado utilizando os iniciadores *NIAi3-F* e *NIAi3-R* (Howarth e Baum, 2002). As condições de amplificação foram como descrita em Howarth e Baum (2002). Os produtos de PCR foram purificados utilizando a enzima ExoSAP IT (USB). O sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc., Sul Coreana, usando os mesmos iniciadores das reações de PCR. As sequências obtidas foram importadas para o programa Sequencher 4.8 (Gene Codes) para edição manual. O alinhamento completo das sequências foi realizado com introdução de *gaps* para compensar a presença de *indels* (inserção/deleção). MrModletest 2.3 (Nylander, 2004) foi fornecido com o conjunto de dados de *NIAi3*. O *Akaike Information Criteria* (Akaike 1973) indicou (GTR+G) como o melhor modelo. MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) foi usado para estimar a filogenia Bayesiana. Cada análise Bayesiana foi realizada usando duas corridas simultâneas de 2 milhões de gerações cada e as primeiras 250 árvores foram descartadas como *burn-in*.

## Resultados e Discussão

O resultado da análise bayesiana a partir de sequências de *NIAi3*, revela que a distinção de subespécies em *M. carthagenensis* não foi apoiada nesse estudo (Figura 1). Os indivíduos de *M. carthagenensis* subsp. *carthagenensis* estão filogeneticamente mais relacionados com os indivíduos de subespécie *M. carthagenensis* subsp *glaziovii*. Esse resultado mostra que os critérios geográfico e morfológico (forma do lóbulo), adotado por Allem (2001) para diferenciar essas subespécies devem ser revistos.

Os resultados evidenciam ainda que *M. carthagenensis* só mantém seu monofiletismo com a inclusão de *M. guaratinica*, ou seja, em se considerando *M. guaratinica* como sinônimo de *M. carthagenensis*, como proposto por Allem (1979).

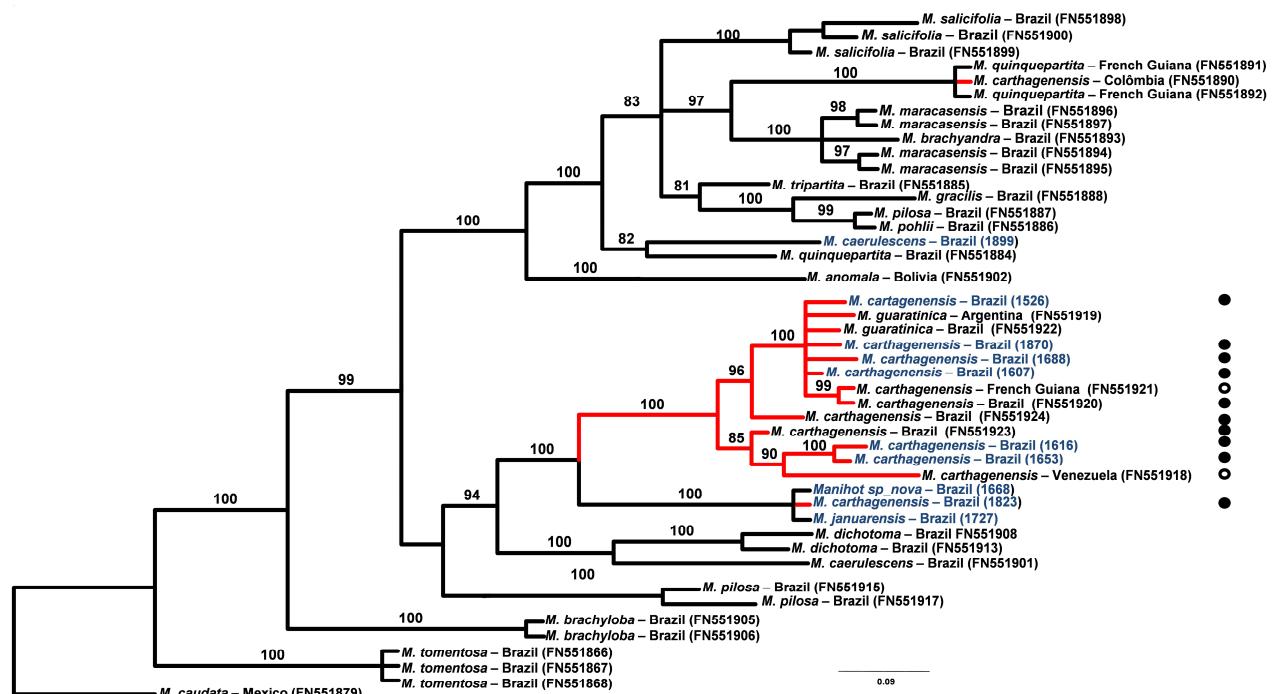
O posicionamento de um único indivíduo de *M. carthagenensis* junto com outros dois de *M. quinquepartita* parece ser consequência de erro de identificação. Essas espécies possuem diferenças de hábito e forma das brácteas bastante evidente. Enquanto *M. carthagenensis* possui hábito subarbustivo a arbóreo e brácteas setáceas, *M. quinquepartita* é uma liana com brácteas foliáceas. Assim, é sugerida uma investigação a partir do material utilizado como voucher.

O indivíduo *M. carthagenensis* – Brazil (1823), juntamente com outras duas espécies distintas formaram um clado irmão do clado que suporta os demais indivíduos de *M. carthagenensis*. Em outra análise, restrita aos acessos do complexo *M. carthagenensis*, *M. januarensis* aparece como basal em relação às demais espécies deste complexo, seguida pelo acesso Brazil (1823). Os três acessos que aparecem como clado irmão na Figura 1 têm ocorrência no noroeste de Minas Gerais e a proximidade do acesso *M. carthagenensis*-Brazil (1823) de *M. januarensis* sugere que a provável origem de *M. carthagenensis* foi nesse tipo de ambiente.



## 16º CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA 1º CONGRESSO LATINO-AMERICANO E CARIBENHO DE MANDIOCA

A confusa nomenclatura em *M. carthagenensis* é resultado da enorme variabilidade morfológica encontrada dentro da espécie, o que torna difícil a identificação correta de seus representantes. Assim, esses resultados são o ponto de partida para a revisão nomenclatural deste complexo e para o conhecimento da história evolutiva de suas populações.



**Figura 1.** Filogenia Bayesiana (árvore consenso) do conjunto de dados de NIAi3 para 45 sequências a partir de 19 espécies de *Manihot* Mill. com *M. caudata* como grupo externo. O comprimento dos ramos é desenhado por escala, os valores de suporte dos nós são dados como probabilidade posterior (%) sobre os ramos. Símbolos distintos são dados para subespécies distintas de *M. carthagenensis*, bolinha preenchida representa a subespécie *glaziovii* e bolinha sem preenchimento representa a subespécie *carthagenensis*.

### Conclusão

A distinção de *Manihot carthagenensis* em subespécies não foi corroborado a partir de dados de NIAi3.

O complexo *Manihot carthagenensis* foi evidenciado com sendo monofilético, com a inclusão das espécies anteriormente reconhecidas como distintas, e, sobretudo com a sinonimização de *M. guaranitica*.

Os dados evidenciam que a provável origem de *M. carthagenensis* se deu em ambientes de Floresta Estacional Decidual (mata seca), uma vez que os acessos mais basais são provenientes desse tipo de ambiente.

### Agradecimentos

A CAPES e CNPq, pelo financiamento da Pesquisa.

### Bibliografia

AKAIKE, H. Information theory and an extension of maximum likelihood principle. In: Petrov, B.N., Csaki, F. (Eds.), **Second International Symposium on Information Theory**. Akademiai Kiado, Budapest, p. 267–281, 1973.

ALLEM, A. C. Notas taxonômicas e novos sinônimos em espécies de *Manihot*. IV. Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 39, p. 735-738, 1979.



16º CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA  
1º CONGRESSO LATINO-AMERICANO E CARIBENHO DE MANDIOCA

ALLEM, A. C., MENDES, R. A., SALOMÃO, A. N. & BURLE, M. L. The primary gene pool of cassava (*Manihot esculenta* Crantz subsp. *esculenta*, Euphorbiaceae). **Euphytica**, v. 120 p. 127–132, 2001.

ALLEM, A. C. Three New Infraspecific Taxa of *Manihot* (Euphorbiaceae) from the Brazilian Neotropics. **Novon**, v. 11 n. 2 p. 157-165, 2001.

COTA-SÁNCHEZ, J. H.; REMARCHUK, K.; UBAYASENA, K. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 24, n. 2, p. 161-167, 2006.

DUPUTIÉ, A.; SALICK, J. & McKEY, D. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. **Journal of Biogeography**. 1:1–11. 2011.

HOWARTH, D. G.; BAUM, D. A. Phylogenetic utility of a nuclear intron from nitrate reductase for the study of closely related plant species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, p. 525-528, 2002.

NASSAR, N. M. A. Wild cassava *Manihot* spp.: biology and potentialities for genetic improvement. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23 p. 201-212, 2000.

NASSAR, N. M. A. Mandioca: Uma opção contra a fome: estudos e lições do Brasil e do mundo. **Ciência Hoje**, v. 39 n. 231 p. 31-34, 2006.

NEVES, R. J.; CARVALHO, P. C. L.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. S.; MARTINS, M. L. L. Wild Species of *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) in the Embrapa Cassava and Fruit Collection, Cruz das Almas, Bahia, Brazil. **Iheringia**. Série Botânica. 2014.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Computer Program Distributed by the Author. **Evolutionary Biology Centre**, Uppsala University, 2004.

RIAHI, M.; ZARRE, S.; MAASSOUMI, A. A.; ATTAR, F.; KAZEMPOUR OSALOO, S. An inexpensive and rapid method for extracting papilionoid genomic DNA from herbarium specimens. **Genet Mol Res**, v. 9, n. 3, p. 1334-1342, 2010.

ROGERS, D. & APPAN, C. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): a computed assisted study. *Flora Neotropica*. (Monograph nº 13) Hafner Press, New York, NY, USA. 1973.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572–1574, 2003.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v.30, p. 2725-2729, 2013.