

VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE MANDIOCA DE MESA ACESSADA POR MEIO DE MARCADORES RAPD

Kenia Gracielle da Fonseca¹, Eduardo Alano Vieira¹, Fábio Gelape Faleiro¹, Graciele Bellon¹, Josefino de Freitas Fialho¹, Mário Ozeas Sampaio dos Santos Filho¹ (¹Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina, DF. E-mail: vieiraea@cpac.embrapa.br)

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

Introdução

As variedades de mandioca são classificadas em mansas ou bravas, dependendo do conteúdo de ácido cianídrico (HCN) em suas raízes. A mandioca mansa, também denominada de mandioca de mesa, aipim ou macaxeira, se diferencia da brava ou industrial, principalmente, por apresentar baixos teores de HCN na raiz, ou seja, abaixo de 100 mg kg⁻¹ de raízes frescas. Assim, elas se destinam aos mercados e feiras livres, para consumo humano *in natura* e as bravas às indústrias de transformação (principalmente farinha e fécula) (Fukuda et al., 2006).

Para a maximização da rentabilidade de qualquer cultura, é fundamental que o material de plantio apresente potencialidade genética, que lhe confira elevada capacidade de produção, resistência as principais pragas e doenças, características tecnológicas e morfológicas favoráveis às práticas culturais e qualidades que atendam as exigências do mercado consumidor. Somente após o atendimento dessas condições, poderá a cultura absorver vantajosamente os custos operacionais e de utilização de insumos modernos, que a tecnificação inevitavelmente acarreta. Neste contexto, o cultivo de mandioca, na região do Cerrado do Brasil Central pode ser considerado como um sistema arcaico de produção (pouco tecnificado) e na sua grande maioria constituído por cultivares tradicionais, que não passaram por um processo de melhoramento genético (Souza e Fialho, 2003).

O cultivo de variedades de mandioca de mesa apresenta potencial de expansão na região do cerrado, onde existe mercado para o produto, a lucratividade é elevada e os produtores têm experiência com a cultura. Entretanto para que essa expectativa se confirme é

necessário que as variedades sob cultivo aliem elevada produtividade a qualidades culinárias superiores, em especial baixo tempo para cocção. Dessa forma, é preciso que sejam geradas por meio do melhoramento genético variedades adaptadas às condições do Cerrado do Brasil Central. Entretanto, para que um programa de melhoramento genético logre êxito é necessário conhecimento a respeito da variabilidade genética dos possíveis genitores a serem empregados em cruzamentos artificiais.

O objetivo do trabalho foi determinar a variabilidade genética entre acessos de mandioca de mesa por meio de marcadores RAPD.

Material e Métodos

Foram analisados 23 acessos de mandioca de mesa mantidos no Banco Regional de Germoplasma de Mandioca do Cerrado (BGMC), que estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Acessos de mandioca de mesa analisados com respectivos nomes comuns e coloração da polpa da raiz.

| Acessos | Nome comum | Coloração da polpa da raiz |
|-----------|------------------------|----------------------------|
| BGMC 982 | Iapar 19/Pioneira | creme |
| BGMC 753 | IAC 756-70/Japonesinha | creme |
| BGMC 1289 | Taquara Amarela | creme |
| BGMC 1290 | Taquara Amarela 1 | creme |
| BGMC 1291 | Taquara Amarela 2 | creme |
| BGMC 1292 | Taquara Amarela 3 | creme |
| BGMC 1266 | Flores de Goiás | branca |
| BGMC 34 | Mantiqueira | branca |
| BGMC 751 | Japonesa | creme |
| BGMC 1246 | Americana | branca |
| BGMC 764 | Não possui denominação | creme |
| BGMC 1254 | Buriti | branca |
| BGMC 1096 | Não possui denominação | branca |
| BGMC 1341 | Pioneira diferente | creme |
| BGMC 962 | Vassourinha | branca |
| BGMC 1250 | Branca de Unai | branca |
| BGMC 1189 | Água morna | creme |
| BGMC 1196 | Não possui denominação | creme |
| BGMC 1277 | Não possui denominação | branca |

| | | |
|-----------|------------------------|--------|
| BGMC 1132 | Cacau | branca |
| BGMC 1268 | Clara de Ovo | branca |
| BGMC 1257 | Cacau Dourada | branca |
| BGMC 768 | Não possui denominação | creme |

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 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μ M de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M 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 11 *primers* decâmeros: OPD (02), OPE (12), OPF (08), OPG (05, 08, 09, 15 e 16), OPH (4, 13 e 15). Foi utilizado um termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 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 μ l 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.

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 acessos, 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 11 *primers* utilizados geraram um total de 120 marcadores RAPD, dos quais 72 (60%) foram polimórficos, evidenciando a existência de elevada variabilidade genética entre os acessos de mandioca de mesa analisados 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 os *primers* utilizados o que evidenciou o maior número de bandas polimórficas foi o OPF-08 com 16 bandas e o que evidenciou o menor número de bandas polimórficas foi o OPH-13 sem nenhuma banda polimórfica (Tabela 2).

A similaridade genética evidenciou que os acessos mais similares foram BGMC 1289 e BGMC 1290 ambos do grupo Taquara Amarela que fenotipicamente também são muito similares e que os menos similares foram BGMC 1268 e BGMC 751.

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

| Primer | Seqüência 5'→3' | Nº de bandas polimórficas | Nº de bandas monomórficas |
|--------------|--------------------|------------------------------|------------------------------|
| OPD-02 | GGACCCAACC | 4 | 3 |
| OPE-12 | TTATCGCCCC | 8 | 4 |
| OPF-08 | GGGATATCGG | 16 | 1 |
| OPG-05 | CTGAGACGGA | 4 | 7 |
| OPG-08 | TCACGTCCAC | 7 | 4 |
| OPG-09 | CTGACGTCAC | 11 | 3 |
| OPG-15 | ACTGGGACTC | 13 | 4 |
| OPG-16 | AGCGTCCTCC | 4 | 4 |
| OPH-04 | GGAAGTCGCC | 1 | 7 |
| OPH-13 | GACGCCACAC | 0 | 5 |
| OPH-15 | AATGGCGCAG | 4 | 6 |
| TOTAL | | 72 | 48 |

A análise da Figura 1 revelou a formação de apenas um agrupamento forte, formado

pelos acessos BGMC 1289, BGMC 1290, BGMC 1291 e BGMC 1292, esse agrupamento já era esperado em razão desses genótipos pertencerem ao grupo de genótipos conhecidos na região do Cerrado como Taquara Amarela que expressam elevada semelhança fenotípica e elevado potencial de produtividade e qualidade de raízes para o consumo humano *in natura*. Do ponto de vista prático esse resultado evidencia que esses genótipos não são completamente similares em nível de DNA e que possivelmente possam também não o ser do ponto de vista agrônomo e que, portanto possam evidenciar características agronômicas diferenciadas e que podem vir a ser úteis para o melhoramento genético e para o lançamento desses acessos como novas variedades de mandioca de mesa.

Os resultados obtidos revelaram a existência de elevada variabilidade genética no grupo de acessos estudados, uma vez apenas os acessos do grupo Taquara Amarela evidenciaram similaridade genética elevada. Os demais acessos avaliados não apresentaram uma tendência de agrupamento de forma hierárquica, ou seja em grupos que evidenciam similaridade dentro dos grupos e divergência entre grupos. Assim fica evidente que os acessos avaliados apresentam variabilidade genética e que essa pode ser utilizada no melhoramento genético. Em relação a recomendação de cruzamento, com exceção dos acessos do grupo Taquara Amarela que não devem ser cruzados entre si, por poderem apresentar depressão endogâmica, os pesquisadores podem optar por qualquer cruzamento envolvendo os genótipos avaliados. Mas para isso é evidente que também devem ser considerados os caracteres agrônômicos e a capacidade de combinação dos acessos.

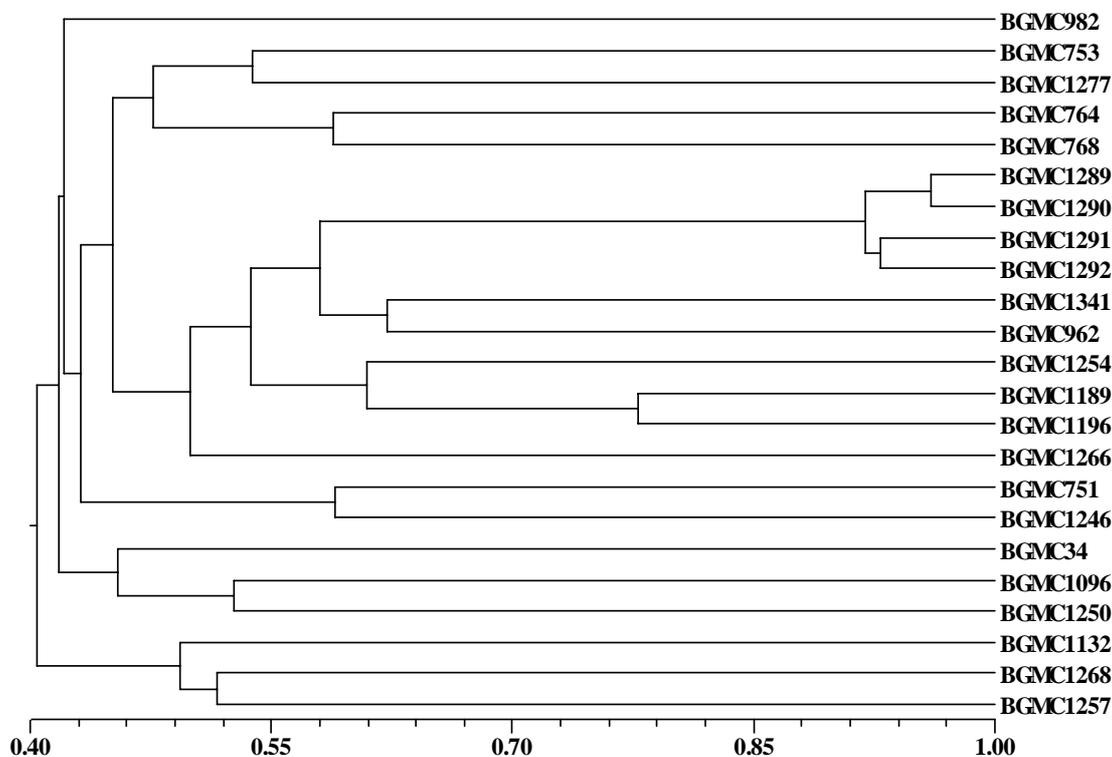


Figura 1. Dendrograma resultante da análise de 23 acessos de mandioca de mesa, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de similaridade genética obtida por meio do coeficiente de Jaccard utilizando-se 120 marcadores RAPD. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,85.

Conclusões

Os marcadores RAPD mostraram eficiência na determinação da variabilidade genética entre acessos de mandioca de mesa e no grupo de genótipos avaliados existe elevada variabilidade genética passível de ser utilizada no melhoramento genético.

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.**
- 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.
- FUKUDA, W.M.G.; FUKUDA, C.; DIAS, M.C.; XAVIER, J.J.B.N.; FIALHO, J.F. Variedades. **In: SOUSA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P. FUKUDA, W.M.G. (ed). Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca.** Cruz das Almas: CPAC, 2006. p.433-454.
- 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.
- SOUZA, L.S.; FIALHO, J.F. **Sistema de produção de mandioca para a região do cerrado.** Cruz da Almas: CNPMF, 2003. 61p.
- ZACARIAS, A.M.; BOTHÁ, A.M.; LABUSCHAGNE, M.T.; BENESI, I.R.M. Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm form Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica**, v.138, p.49-53, 2004.