

Variabilidade Genética entre Acessos de Espécies Silvestres de *Manihot* e Cultivares de Mandioca por Meio de Marcadores RAPD

Thamyres Cardoso da Silveira¹; Carlos Alberto da Silva Ledo²; Livia de Jesus Vieira³; Cláudia Fortes Ferreira²

Resumo

Este trabalho tem por objetivo realizar a caracterização molecular de acessos silvestres de *Manihot* e cultivares de mandioca com o intuito de avaliar a variabilidade genética disponível para ser explorada dentro do programa de melhoramento genético de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram caracterizados por meio de marcador molecular RAPD 20 acessos de espécies do gênero *Manihot*, oriundos da coleção de trabalho da Embrapa. Os dados obtidos foram submetidos à análise multivariada de agrupamento a partir da matriz de distância calculada pelo índice de dissimilaridade de Jaccard. Os agrupamentos hierárquicos foram obtidos pelo método UPGMA e a validação dos agrupamentos determinada pelo coeficiente de correlação cofenético. O marcador molecular RAPD mostrou-se eficiente na separação dos genótipos demonstrando existir variabilidade genética suficiente para ser explorada no melhoramento genético de mandioca.

Introdução

Bancos de germoplasma têm como finalidade principal preservar a variabilidade genética, seja de espécies silvestres ou cultivadas. A caracterização é um ponto de partida para o conhecimento da variabilidade sendo indispensável para o manejo de coleções de germoplasma, já que visa a obtenção de dados para descrever, identificar e diferenciar acessos dentro de espécies, classes ou categorias, utilizando para isso descritores adequados (Querol, 1988; Vicente *et al.*, 2005).

Espécies silvestres do gênero *Manihot*, embora pouco estudadas, são importantes reservatórios de alelos de interesse a serem transferidos para espécies cultivadas visando o desenvolvimento de variedades melhoradas que sejam mais resistentes a fatores bióticos e abióticos e que expressem maior produtividade (Nassar, 2006).

Grupos de características distintas são utilizados na atividade de caracterização e avaliação do germoplasma, destacando-se as características morfológicas, agrônômicas e moleculares.

A utilização de marcadores moleculares na caracterização de germoplasma de mandioca vem crescendo nos últimos anos, principalmente por eles não sofrerem influência do ambiente e permitirem a obtenção de grande quantidade de informação referente ao genoma da espécie estudada (Colombo *et al.*, 2000; Carvalho; Achaal, 2001; Elias *et al.*, 2001). O marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido muito utilizado em estudos de diversidade em função de ser pouco oneroso, gerar alto grau de polimorfismo e poder ser utilizado em qualquer espécie.

O presente trabalho teve por objetivo quantificar a variabilidade genética em 20 acessos de espécies silvestres de *Manihot* e variedades de mandioca utilizando marcador RAPD.

Material e Métodos

Para a caracterização molecular, o DNA total foi extraído de folhas jovens dos 20 acessos de espécies silvestres de *Manihot* e de cultivares de mandioca seguindo a metodologia proposta por Doyle & Doyle (1990). O DNA depois de extraído foi quantificado em agarose 0,8 %, visualizado em transiluminador e a concentração ajustada para 10 ng/μL para posterior amplificação. As reações de amplificação para o marcador molecular RAPD foram conduzidas de acordo com o protocolo descrito por Williams *et al.* (1990) e posteriormente completadas para volume final de 15 μL, contendo os seguintes reagentes: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 2,4 mM, 100 μM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,2 μM do primer (Operon Technologies, Alameda, CA, EUA), 25 ng do DNA e uma unidade de *Taq* polymerase (Biosystems). As amplificações foram conduzidas em termociclador PCR System 9600 thermocycler com o seguinte programa de amplificação: uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95° C por 1 min., seguido de 45 ciclos, cada um consistindo de: desnaturação a 94° C por 1 min.; pareamento do primer a 35° C por 1 min. e extensão do

¹ Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Bolsista de PIBIC da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Rua Embrapa, s/n, Caixa Postal 07, Cruz das Almas - BA, E-mail: tcssilveira@gmail.com

² Eng. Agr., D.Sc., Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

³ Estudante de doutorado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

fragmento de DNA pela *Taq* polimerase a 72° C por 2 min. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5%, 1X TBE (EDTA 2 mM e Tris-borate 90 mM), contendo brometo de etídio, 0,5 µl mL⁻¹ e os géis fotografados com o sistema Vilber Lourmat de fotodocumentação.

Foi realizada análise de agrupamento para os dados moleculares utilizando-se o índice de dissimilaridade de Jaccard, sendo que os dados foram computados como ausência (0) e presença (1). Utilizou-se o programa GENES (Cruz, 2003) para obtenção da matriz de distância genética. Os agrupamentos hierárquicos foram obtidos pelo método UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (Sneath & Sokal 1973). A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (Sokal e Rohlf, 1962). A significância do coeficiente de correlação cofenético foi calculada pelo teste de Mantel com 1000 permutações (Mantel, 1967). O dendrograma foi obtido pelo programa Statistica 7.1 (Statsoft, 2005).

Resultados e Discussão

Os 15 iniciadores geraram um total de 165 bandas polimórficas, com uma média de 11 bandas por iniciador. O iniciador OPI 11 apresentou o maior número de bandas, 17 e o iniciador OPAL 7 o menor número de bandas 7.

A Figura 1 apresenta o resultado de uma amplificação via RAPD utilizando-se o iniciador OPJ-01 em gel de agarose 1,5%.

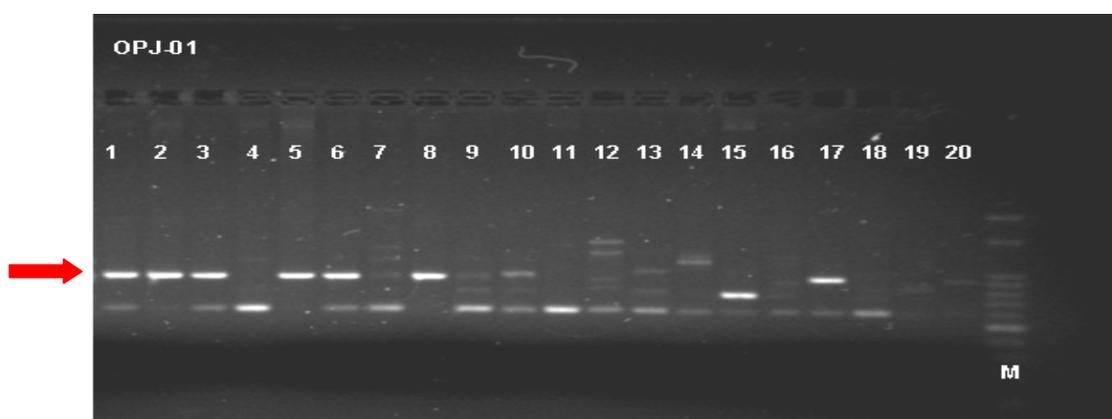


Figura 1. Resultado da amplificação com o iniciador OPJ-01 em gel de agarose 1,5%. 1: Engana Ladrão; 2: Mocotó; 3: Amansa Burro; 4: Do Céu; 5: Fio De Ouro; 6: Paulo Rosa; 7: Jaboti; 8: Cacau; 9: Xingu; 10: Macaxeira Branca; 11: Irw A02707; 12: Dic 60204; 13: ComDF 07; 14: Ano 074v02; 15: Man 065; 16: CaeBM 20; 17: Per 009v; 18: Gla 59012; 19: FRF 1522; 20: Jac 04. M=marcador de 50 pb (Invitrogen®). Seta indica banda polimórfica.

Na Figura 2 está representado o dendrograma de dissimilaridade baseado nas bandas geradas a partir dos primers RAPD. Baseando-se no critério do ponto de fusão, verificou-se a formação de dez grupos distintos entre os genótipos avaliados. No grupo um, concentraram-se todas as variedades de mandioca e a espécie silvestre *Manihot anomala*. Os demais grupos foram formados cada um com uma espécie silvestre avaliada. A menor distância genética foi verificada entre as variedades de mandioca Jaboti e Xingu (0,22) e a maior distância genética entre as espécies que tem como sigla FRF 1522 e Man 065 (0,90). O valor médio da distância genética foi de 0,66 O valor do coeficiente de correlação cofenético foi de 0,96**, valor alto e adequado, uma vez que de acordo com Vaz Patto et al. (2004), $r > 0,56$ é considerado ideal, refletindo uma boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

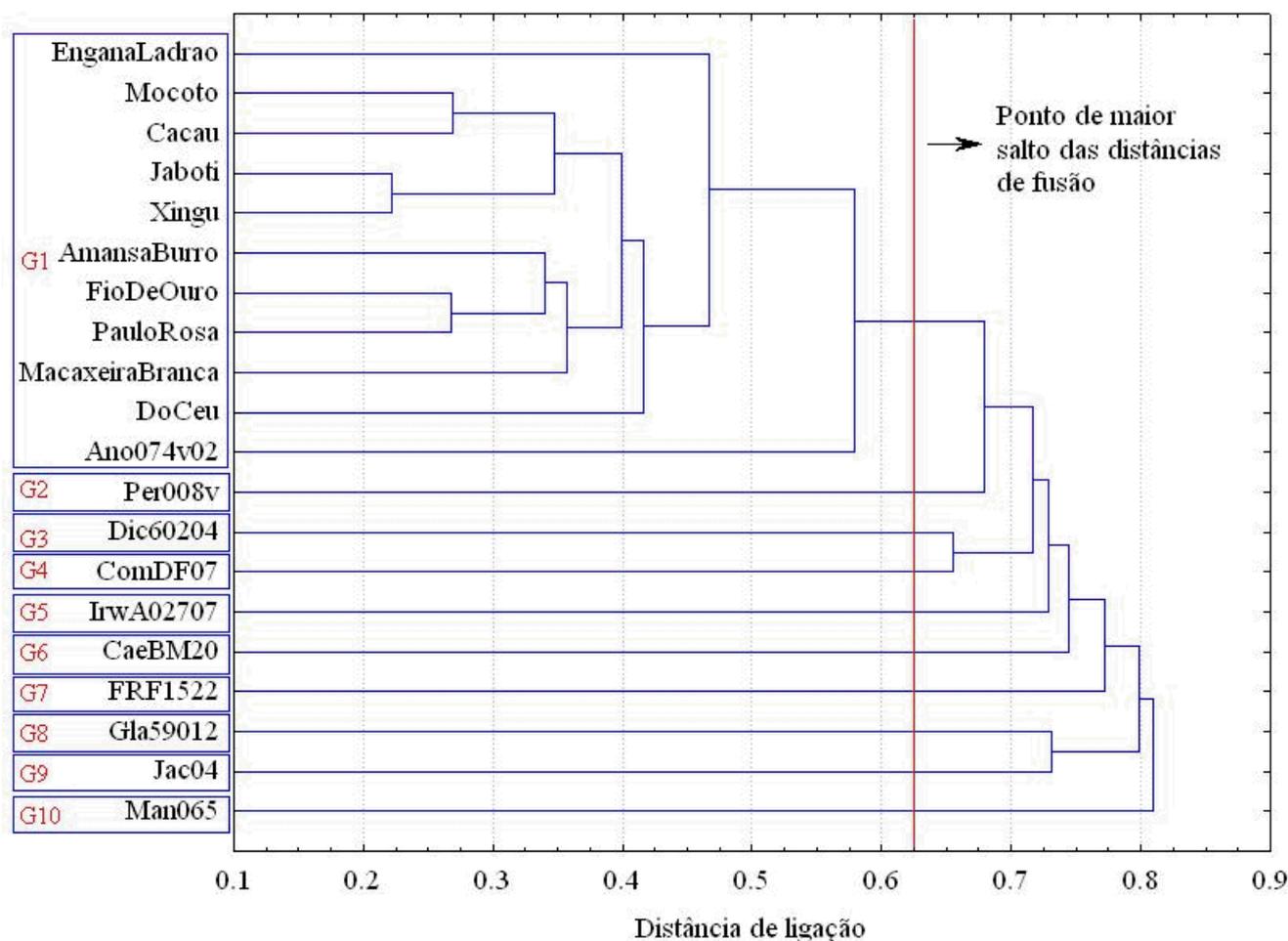


Figura 2. Dendrograma de dissimilaridade baseado na distância de Jaccard para os dados moleculares em acessos de espécies silvestres de *Manihot* e cultivares de mandioca.

Os marcadores moleculares do tipo RAPD mostraram-se eficientes na separação dos genótipos em 10 grupos distintos, demonstrando existir variabilidade suficiente a ser explorada no programa de melhoramento genético da mandioca. Esses marcadores representam uma importante ferramenta para o estudo da diversidade genética. Tais informações servirão para direcionar a escolha de genitores em cruzamentos visando a obtenção de variedades de mandioca resistentes/tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos que acometem a cultura.

Referências

Carvalho LJCB, Achaal BA (2001) Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica** **120**: 130-140.

Colombo C, Second G, Charrier A (2000) Diversity within American cassava germ plasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology** **23**: 189-199.

Cruz CD (2003) **Programa Genes**, Versão Windows (2003.0.0). UFV, Viçosa, Brasil.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**: 13-15.

Elias M, Penet L, Vindry P, Mckey D, Panaud O, Robert T (2001) Unmanaged sexual reproduction and the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in a traditional farming system. **Molecular Ecology** **10**: 1895-1907.

Mantel N (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research** **27**: 209-220.

Nassar NMA (2006) Mandioca: Uma opção contra a fome estudos e lições do Brasil e do mundo. **Ciência hoje** **39**: 31-34.

Querol D (1988) **Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado**: aproximación técnica y socioeconómica. Lima, Perú, 218p.

Sneath PH, SOKAL RR (1979) **Numerical taxonomy**: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 573p.

Sokal RR, ROHLF FJ (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon** **11**: 33-40.

Statsoft Inc. (2005) **Statistica for Windows (data analysis software system)**, version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA).

Vaz patto MC, Satovic Z, Pêgo S, Feveiro P (2004) Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica** **137**: 63-67

Vicente MC, Guzmán FA, Engels J, Ramanatha RAOV (2005) Genetic Characterization and its use in decision making for the conservation of crop germplasm. In: **The Role of Biotechnology**, 2005. Turin. **Proceedings...**, Turin: [s.n.], p. 121-128.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** **18**: 6531-6535.