

Diversidade Genética entre Parentais Elite de Mandioca como Ferramenta para Desenvolvimento de Novas Variedades

Yslai Silva Peixouto¹, Janáira Lopes dos Santos Carneiro¹, Leila Andrade Bastos¹, Danilo Rocha Velame¹, José Henrique Oliveira Santos Júnior¹, Edímille Vivian Batista Menezes Ramalho¹, Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira¹, Éder Jorge Oliveira², Vanderlei da Silva dos Santos², Claudia Fortes Ferreira²

Resumo

A mandioca é uma planta alógama, altamente heterozigótica e com uma ampla segregação na geração F1. Essa cultura exerce um importante papel sócio-econômico não somente no Brasil, mas também no contexto mundial por ser uma cultura de subsistência. O conhecimento prévio da diversidade genética de variedades parentais usadas em cruzamentos controlados é de suma relevância para garantir o desenvolvimento de novas variedades produtivas, que apresentem características agronômicas favoráveis e resistência às principais pragas. Foram utilizadas 16 variedades elite de mandioca pertencentes ao BAG-Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os microssatélites foram capazes de separar as variedades em 6 grupos demonstrando existir variabilidade suficiente para ser explorada nos cruzamentos dialélicos.

Introdução

A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta importante papel econômico e social; sobretudo por ser considerada alimento básico para quase um bilhão de pessoas em todo o mundo. Em 2009, a produção mundial e nacional de mandioca foi estimada em 233,7 milhões de toneladas e 24,4 milhões de toneladas, respectivamente e área colhida de 18,9 milhões e 1,17 milhão de hectares (FAO 2011). Embora a mandioca exerça um papel expressivo no cenário mundial, a produtividade da mesma, principalmente no Brasil, tem se mantido constante ao longo dos anos sem acréscimos significativos. Essa falta de incremento na produtividade pode ser atribuída ao fato da cultura ser afetada por vários fatores bióticos e abióticos que resultam em expressivas perdas no rendimento. Entretanto, esse quadro pode ser alterado pelo desenvolvimento de variedades mais adaptadas aos diferentes sistemas de cultivo.

Como uma das etapas de um programa de melhoramento, o conhecimento prévio da diversidade genética de genótipos parentais usados em cruzamentos controlados é de suma importância para maximizar a segregação nas populações segregantes e com isso aumentar a chance de desenvolvimento de genótipos superiores, que apresentem características agronômicas favoráveis e resistência às principais pragas. A diversidade genética pode ser estimada por meio de técnicas biométricas, seja pelo uso de métodos preditivos que se baseiam em informações fenotípicas e genotípicas, acessadas pela observação de diferenças morfológicas, fisiológicas ou moleculares. Com os significativos avanços nas técnicas que utilizam marcadores moleculares, em virtude do maior grau de informação sobre a diversidade genética dos indivíduos, é grande o número de trabalhos que estimam a diversidade em populações de mandioca por meio dessas ferramentas (Siqueira et al. 2009; Fregene et al. 2003; Elias et al. 2000).

Um tipo especial de marcador que possibilita o estudo da variabilidade são os marcadores moleculares do tipo SSR-*Simple Sequence Repeats* (microssatélites), por possuírem natureza co-dominante, serem altamente polimórfico, amplamente distribuídos no genoma e apresentarem elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC-*Polymorphism Information Content*) (Ferreira e Grattapaglia 1998). O principal objetivo do presente trabalho é estudar a variabilidade genética entre parentais elite do programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura, para validação da correlação entre distância genética e heterose de forma a orientar cruzamentos em função do contraste entre parentais. Foram utilizados 43 marcadores do tipo SSR que possibilitaram a separação entre os acessos em 6 grupos maiores. A menor distância entre as variedades elite foi de 0.28 e a maior 0.70, demonstrando haver variabilidade genética a ser explorada entre as variedades. Esse trabalho oferece informações preliminares para a obtenção de variedades de mandioca mais produtivas, com boas características agronômicas e com resistência às principais doenças.

Material e Métodos

Material genético

¹ Estudantes de Graduação e Pós-Graduação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, respectivos e-mails: yslaipeixouto@hotmail.com, janairacarneiro@hotmail.com, leilynhabastos@hotmail.com, danilexvel@hotmail.com, jhhenrique@hotmail.com, viih_viih@hotmail.com, gfachardo@yahoo.com.br

² Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, respectivos e-mails: eder@cnpmf.embrapa.br, vssantos@cnpmf.embrapa.br, claudiaf@cnpmf.embrapa.br

Foram utilizadas 16 genótipos elite de mandioca (contrastantes para teor de matéria seca, produtividade e resistência a pragas e doenças) pertencentes ao programa de melhoramento de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, a citar: BRS Formosa, BRS Mani Branca, Cidade Rica, BRS Mulatinha, BRS Verdinha, Lagoa, Ecu-72, Irará, BRS Kiriris, BRS Guairá, Sergipe, Baianinha, Olho Junto, Cascuda, Fécula Branca e Col-22.

Extração e amplificação de DNA

Foram coletadas folhas jovens de mandioca e a extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Para verificação da qualidade e quantidade do DNA extraído, um total de 3µl do DNA foi aplicado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo e submetido à eletroforese. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa com um DNA de concentração conhecida (DNA lambda). Após a quantificação, a concentração das amostras foi ajustada para 2,5 ng•L⁻¹ por meio da diluição destas em tampão TE, a fim de realizar as reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Um total de 43 *primers* SSRs foram utilizados em reações de PCR contendo os seguintes reagentes: 20 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 100 µM de cada dNTPs, 0,2µM de cada primer e 0,75 U de *Taq* em tampão 10x (Biosystems) em volume final de 16 •L. Os seguintes ciclos foram utilizados para a amplificação em termociclador MyCycler Thermocycler (BioRad): 94°C por três minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 segundo, 55 °C, 58°C, 60°C ou 62°C (dependendo de cada *primer*) por 40 segundos e 72°C por um minuto, com uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram revelados em gel de agarose 4 % (p/v), durante 4 horas. Utilizou-se padrão de peso molecular de 50 pb para análise dos fragmentos. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 mg.mL⁻¹), visualizado em transiluminador com luz UV (UVITEC, Modelo SXT 40 M) e fotografado em sistema fotodocumentação (Vilber Lourmat).

A diversidade genética dos genótipos elite de mandioca foi determinada por meio da matriz de dissimilaridade genética usando o índice não ponderado, gerada pelo programa GENES (Cruz 2003). O dendrograma foi construído utilizando-se o comando *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) (Sneath e Sokal 1973) e o software package do programa STATISTICA (Statistica 2002).

A correlação cofenética entre a matriz de distância e a matriz de agrupamento, foi calculada por meio do programa GENES (Cruz 2003) e os valores de PIC (*polymorphism information content*) dos microssatélites estimados pelo programa POWERMARKER (Liu e Muse 2005).

Resultados e Discussão

As regiões contendo sequências simples repetidas (SSRs) foram amplificadas individualmente por meio PCR utilizando um par de *primer* específicos. Um total de 43 *primers* SSRs foram utilizados em reações de PCR e amplificados em gel de agarose 4% (Figura 1).

Observaram-se altos valores para conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos microssatélites utilizados, em que cerca de 50% dos valores de PIC estavam acima de 0,5, demonstrando serem altamente informativos e apropriados para uso nesse tipo de estudo.

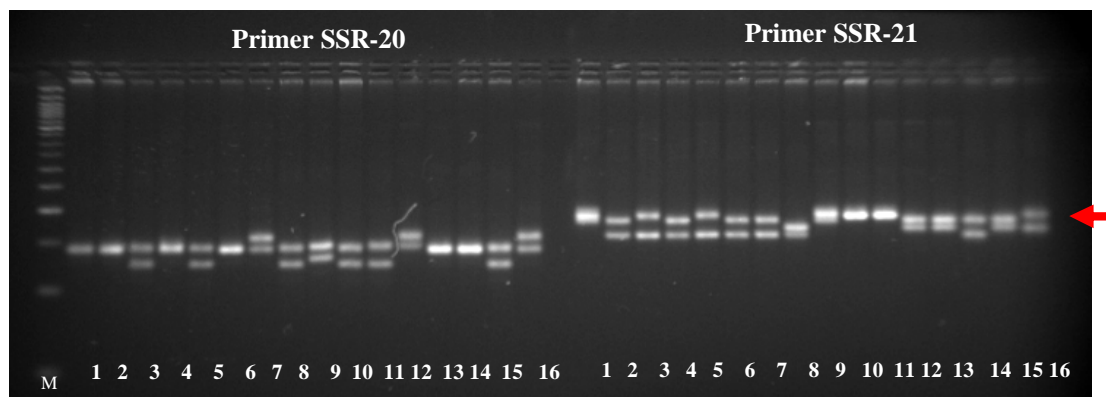


Figura 01. *Primers* SSR 20 e SSR 21. 1 - BRS Formosa, 2 - BRS Mani Branca, 3 - Cidade Rica, 4 - BRS Mulatinha, 5 - BRS Verdinha, 6 - Lagoa, 7 - Ecu - 72, 8 - Irará, 9 - BRS Kiriris, 10 - BRS Guairá, 11 - Sergipe, 12 - Baianinha, 13 - Olho Junto, 14 - Cascuda, 15 - Fécula Branca, 16 - Col - 22. M= Marcador ladder 50 pb (Invitrogen). Seta vermelha = padrão de bandejamento obtido pelos primers SSR-20 e SSR-21.

O dendrograma baseado nas informações obtidas pelos SSRs possibilitou a formação de 6 grupos distintos (ponto de corte definido de acordo com os critérios propostos por Mingoti 2005) (Figura 2). Os genótipos foram agrupados com a seguinte distribuição: G1: BRS Formosa e BRS Mani Branca, G2: BRS Mulatinha, Lagoa, Cascuda, BRS Verdinha, Fécula Branca, Col-22, Irapá, BRS Guaíra, Baianinha e Olho junto, G3: Cidade Rica, G4: Sergipe, G5: BRS Kiriris e a variedade Ecu-72 no G6, separadamente.

É importante enfatizar que as distâncias genéticas foram elevadas para a maioria das comparações, o que a princípio demonstra correlação com a divergência destes genótipos em relação a características fenotípicas. A escolha destes genitores para serem utilizados em cruzamentos dialélicos foi baseada no contraste para características de maior importância agrônômica, tais como produtividade, teor de matéria seca e resistência a pragas e doenças, sobretudo ácaros e bacteriose, respectivamente.

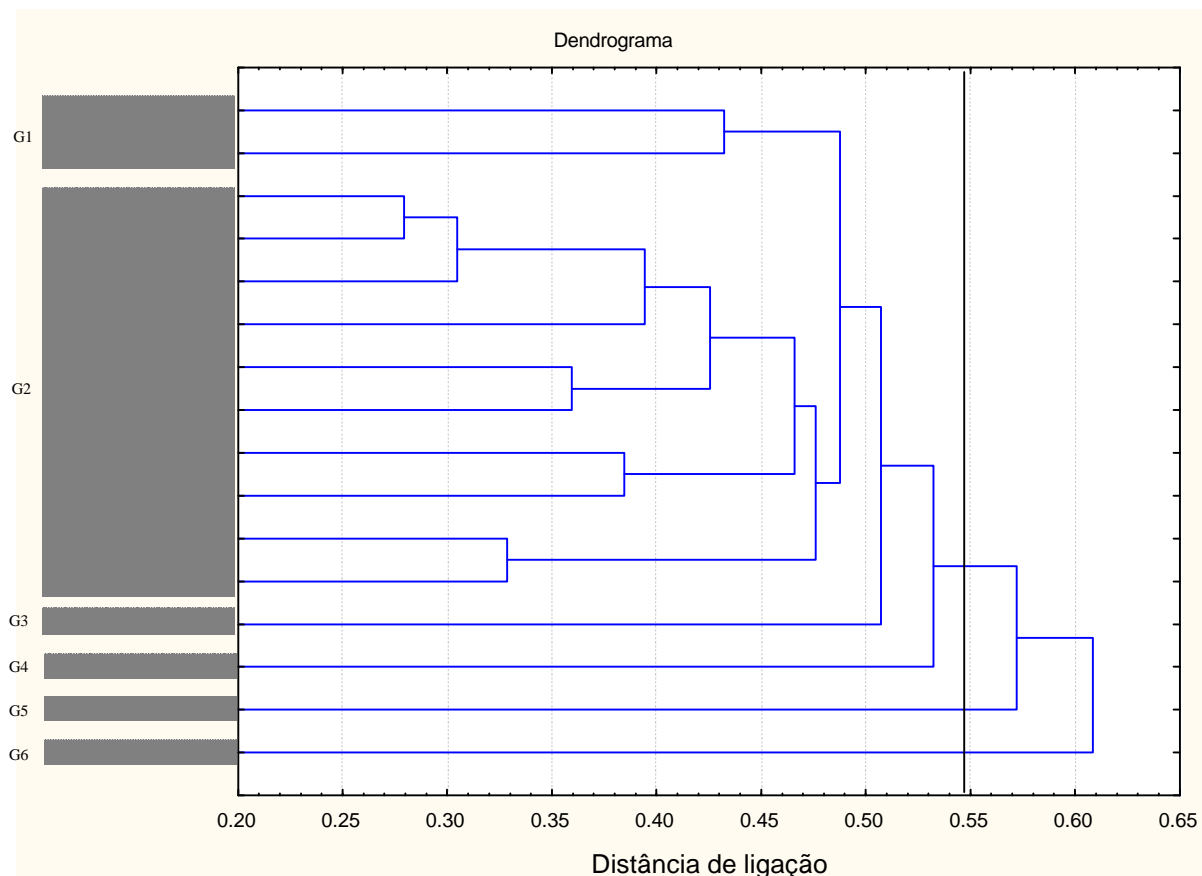


Figura 2. Dendrograma construído a partir de bandas provenientes de 43 marcadores SSRs utilizando-se o método UPGMA de agrupamento pelo programa STATISTICA (Statistica, 2002).

O valor da correção cofenética foi de 0,74, considerado 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.

De acordo com os valores da matriz de dissimilaridade, as variedades mais próximas geneticamente (0,28), foram a BRS Mulatinha e Lagoa e as mais distantes geneticamente (0,70), a Ecu-72 e Cidade Rica. A princípio, esse cruzamento seria o mais promissor. Outra combinação também promissora seria entre as variedades Ecu-72 e BRS Mani Branca, juntamente com a BRS Kiriris e Cascuda, que apresentaram um valor de dissimilaridade de 0,67. Entretanto, estas indicações precisam ser confirmadas em futuros ensaios de avaliação dos híbridos F1 na primeira geração clonal, uma vez que a produção de raízes oriundas de plantas descendentes de sementes não apresentam o mesmo formato e potencial produtivo em comparação com plantas oriundas de propagação vegetativa.

Os marcadores microssatélites foram capazes de separar os genótipos elite de mandioca de forma a contribuir em trabalhos futuros de associação entre distância genética e heterose, e assim direcionar os cruzamentos mais promissores, entre parentais contrastantes, o desenvolvimento de variedades de mandioca mais produtivas e resistentes/tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos que afetam a cultura.

Agradecimentos

À FAPESB pela concessão da bolsa PIBIC e à Embrapa pelo financiamento do projeto.

Referências

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

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

Elias M, Panud O, Robert T (2000) Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. **Heredity** 85: 219–230

FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), disponível em: <http://faostat.fao.org/>, acessado em 22 de maio de 2011.

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, Editora Embrapa-Cenargen, Brasília, 220p.

Fregene MA, Suarez M, Mkumbira J, Kulembeka H, Ndedya E, et al. (2003) Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in asexually propagated crop. **TAG** 107: 1083-1093.

Liu K and Muse SV (2005) POWERMARKER: Integrated analysis environment for genetic marker data – *Bioinformatics* 21 (9): 2128-2129 (2005).

Mingoti SA, (2005) **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**, Editora UFMG, Belo Horizonte, 295p.

Siqueira MVBM, Queiroz-Silva JR, Bressan EA, Borges A, Pereira KJC, Pinto JG, Vealey EA (2009) Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetic Molecular Biology** 32:104-110.

Sneath PHA and Sokal RR (1973) **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco.

Statistica (2002) STATISTICA for Windows v. 6.0: Computer Program Manual. Editora StatSoft Inc. Tulsa, UK (CD-Rom)

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