

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA COLEÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Manihot* DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA

Carlos Alberto da Silva Ledo¹, Alfredo Augusto Cunha Alves², Thamyres Cardoso da Silveira³,
Ariana Silva Santos³, Cláudia Fortes Ferreira¹, Éder Jorge de Oliveira¹

¹Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, e-mail: ledo@cnpmf.embrapa.br

²Embrapa/LABEX-USA, National Center for Genetic Resources Preservation (NCGRP/ARS/USDA),

Fort Collins, CO. ³Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.

Introdução

A mandioca constitui a base alimentar de cerca de 700 milhões de pessoas no mundo, sendo considerada a quarta fonte mais importante de carboidratos nos trópicos, superada apenas pelo arroz, cana-de-açúcar e milho (CIAT, 1993). O Brasil é centro de origem e de diversidade do gênero *Manihot*, sendo que a espécie *M. esculenta* é cultivada em praticamente todas as regiões, ocupando papel de destaque na alimentação humana e animal (Lorenzi e Dias, 1993).

Espécies silvestres de *Manihot* são importantes reservatórios de genes de interesse a serem transferidos para espécies cultivadas, visando o desenvolvimento de variedades melhoradas de mandioca que sejam mais resistentes a fatores bióticos e abióticos e mais produtivas (Nassar, 2006).

A atividade de caracterização é indispensável para o manejo de coleções de germoplasma, já que tem por objetivo 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).

Entre os caracteres fenotípicos, os agronômicos apesar de sua importância, não são muito adequados para a caracterização de germoplasma por serem muito influenciados pelo ambiente, o que exige a avaliação dos acessos em experimentos mais elaborados (Elias *et al.*, 2001). Com isso, descritores morfológicos e moleculares têm sido mais utilizados nesta atividade por serem menos influenciados pelo ambiente. Os descritores morfológicos são facilmente visíveis e proporcionam menores custos, quando comparados com os agronômicos e moleculares. A utilização de marcadores moleculares na caracterização de germoplasma de mandioca vem crescendo nos últimos anos,

principalmente por permitirem a obtenção de grande quantidade de informação referente ao genoma da espécie estudada (Colombo *et al.*, 2000; Carvalho e Achaal, 2001; Elias *et al.*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização da coleção de espécies silvestres de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura por meio do emprego de descritores morfológicos e marcadores moleculares e posterior agrupamento para definição da diversidade genética entre os acessos.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado com acessos pertencentes a coleção de espécies silvestres de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia. A coleção foi instalada em campo no ano de 2007, sendo representadas por 628 acessos, pertencentes a aproximadamente 25 espécies.

Para a caracterização morfológica, foram caracterizados por meio de 32 descritores morfológicos, 475 acessos da coleção. Dentre os descritores utilizados na caracterização, 10 foram quantitativos e 22 qualitativos. Como o programa de melhoramento genético de mandioca da Embrapa tem utilizado espécies silvestres de *Manihot* para obtenção de híbridos interespecíficos, foram criados novos descritores (comprimento da haste sem folha e presença de látex) e novas classes fenotípicas para os descritores já existentes (forma do lóbulo e cor dos ramos terminais) segundo o manual de descritores morfológicos e agronômicos para a mandioca proposto por Fukuda e Guevara (1998) e utilizados neste trabalho.

Para a caracterização molecular, estão sendo desenvolvidos diversos estudos no laboratório de Biólogo Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, com marcadores moleculares RAPD e microssatélites, envolvendo aproximadamente 100 acessos da Coleção de Espécies Silvestres de *Manihot* e algumas variedades de mandioca do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa. A extração de DNA foi feita a partir de folhas jovens seguindo a metodologia descrita por Doyle & Doyle (1990). As análises moleculares seguiram a metodologia proposta por Williams *et al.* (1990).

Foi também realizado um estudo para identificação de possíveis acessos de espécies silvestres de *Manihot* e variedades de mandioca resistentes ao vírus do mosaico africano utilizando marcador microssatélite. Foi utilizado o DNA de 20 plantas, sendo 10 variedades de mandioca e 10 espécies silvestres. Os acessos selecionados foram avaliados com dois marcadores microssatélites (SSRY28 e NS158) e um marcador do tipo SCAR - *Sequence-Characterized Amplified Region* (RME1) segundo metodologia descrita por Fregene *et al.* (2006).

Tanto para a caracterização morfológica, quanto para a molecular, foram realizadas análises multivariadas de agrupamento a partir das matrizes de distâncias genéticas e método de agrupamento

UPGMA. A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (Sokal e Rohlf, 1962).

Resultados e Discussão

Para a caracterização morfológica, obteve-se um coeficiente de correlação cofenético de 0,85**, indicando uma alta correlação entre as matrizes de distância e de agrupamento. O agrupamento dos acessos pelo método de UPGMA possibilitou a formação de 14 grupos de dissimilaridade, evidenciando a presença de diversidade genética entre os acessos avaliados. Vieira *et al.* (2007), trabalhando com análise de agrupamento de Tocher detectaram ampla variabilidade genética com base em descritores morfológicos para 356 acessos de *M. esculenta*. Resultados semelhantes foram também obtidos por Campos *et al.* (2010) na avaliação de 53 acessos de *M. esculenta*, utilizando análise de agrupamento para descritores qualitativos e quantitativos separadamente. A caracterização e avaliação realizadas com base em características quantitativas e qualitativas servem de suporte para trabalhos de melhoramento mais eficiente.

Na análise considerando o marcador RAPD, verificou-se a formação de dez grupos distintos entre os genótipos avaliados. O valor do coeficiente de correlação cofenético foi de 0,96** refletindo uma boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento. Os marcadores moleculares do tipo RAPD mostraram-se eficientes na separação dos genótipos demonstrando existir variabilidade suficiente a ser explorada no programa de melhoramento genético da mandioca.

Para o estudo relativo à avaliação da variabilidade genética de acessos de *Manihot* da Coleção da Embrapa via marcador molecular SSR, foram realizados a extração e quantificação de 85 acessos. Após a amplificação e análise dos dados espera-se determinar a variabilidade genética presente nos acessos avaliados de forma que estes possam ser utilizados em programas de hibridação visando à obtenção de cultivares de mandioca tolerantes/resistentes a fatores bióticos e abióticos.

O ensaio para identificação de genótipos resistentes ao Vírus do Mosaico Africano (AMV) detectou que nenhum dos genótipos avaliados apresentou marcas associadas aos iniciadores NS158 e RME1 sendo assim, não foram encontrados materiais que apresentassem tamanho de fragmento específico relacionado aos quatro iniciadores utilizados, contudo os genótipos que apresentaram alguma marca atrelada a um dos iniciadores específicos podem ser usados em trabalhos posteriores visando à incorporação desse gene de resistência.

Conclusões

A utilização de descritores morfológicos e de marcadores moleculares evidenciou a existência de diversidade genética entre os acessos da coleção de espécies silvestres da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Alguns dos acessos presentes na coleção de espécies silvestres de *Manihot* mostraram-se promissores, indicando que os mesmos podem ser utilizados em programas de melhoramento para obtenção de híbridos interespecíficos melhorados entre espécies silvestres e variedades de mandioca.

Referências

CAMPOS, A.L. de; ZACARIAS, A.J.; COSTA, D.L.; NEVES, L.G; BARELLI, M.A.A; SOBRINHO, S.P; LUZ, P.B. Avaliação de acessos de mandioca do banco de germoplasma da UNEMAT Cáceres - Mato Grosso. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 04, n. 2, p. 44-54, 2010.

CARVALHO, L.J.C.B.; ACHAAL, B.A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, v. 120, p. 130-140, 2001.

CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. **Cassava report 1987-1989 – Cali, Colômbia**: CIAT, 1993. 621p. (Working document, 91).

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germ plasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 189-199, 2000.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p:13-15, 1990.

ELIAS, M.; PENET, L.; VINDRY, P.; McKEY, D.; PANAUD, O.; ROBERT, T. 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**, v. 10, n. 8, p. 1895-1907, 2001.

FREGENE, M.A.; MORANTE, N.; SÁNCHEZ, T. et al. Molecular markers for the introgression of useful traits from wild *Manihot* relatives of cassava, marker-assisted selection of disease and root quality traits. **J. Root Crops**, v. 32, p.1–31, 2006.

FUKUDA, W.M.G.; GUEVARA, C.L. **Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).** Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1998. 38 p. (EMBRAPA – CNPMPF. **Documento, 78**).

LORENZI, J.O.; DIAS, C.A.C. **Cultura da mandioca.** Campinas: CATI, 1993. 41 p.

MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada – Uma abordagem aplicada.** Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. 297 p.

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

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

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11 p.33-40. 1962.

VICENTE, M.C.; GUZMÁN, F.A.; ENGELS, J.; RAMANATHA RAO, V. 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.], 2005. p. 121-128.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J. de F.; SILVA, M.S.; FALEIRO, F.G. **Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do cerrado acessada por meio de descritores morfológicos.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 15p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 129).

WILLIAMS, J.G.K.; KUBLELIK, A.R.; LIVAK, K.J. DNA polymorphisma amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.