



DESENVOLVIMENTO DE “INTER-RETROTRANSPONON AMPLIFIED POLYMORPHISM” PARA ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM GERMOPLASMA DE MANDIOCA

ANA MARA OLIVEIRA DA SILVA¹; GILVAN FERREIRA DA SILVA²; MIGUEL COSTA DIAS³; ÁTILA SOUZA⁴; CHARLES ROLAND CLEMENT⁵; NELCIMAR REIS SOUSA⁶

1. PPGBIOTEC-UFAM, MANAUS, AM, BRASIL; 2,3,6 EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL; 4. MBT-UEA, MANAUS, AM, BRASIL; 5. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Resumo: A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, possui importância econômica na maioria dos países tropicais e subtropicais. A variabilidade genética da espécie não foi totalmente explorada e novas informações podem ajudar a expandir seu uso. Os marcadores moleculares baseados em retrotransposons, devido a sua abundância no genoma, permitem uma eficiente análise de diversidade genética. O IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) é baseado no polimorfismo entre retrotransposons, possui uma alta reprodutibilidade, elevado nível de polimorfismo e baixo custo. O objetivo deste trabalho foi desenvolver primers para IRAP em mandioca. Oito diferentes retrotransposons do tipo LTR foram selecionados para o desenvolvimento de IRAP e os primers baseados nestes elementos foram denominados de ME_1 a ME_8. Foram analisados 21 indivíduos (12 de Anori/AM, 6 Anamã/AM e 3 da Bahia) provenientes do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental. O percentual de loci polimórficos, heterozigotidade esperada (*h) e o Índice de Shannon (*I) foram calculados usando o software PopGene 1.31. Dos oito primers desenvolvidos, dois deles (ME_1 e ME_3) produziram poucas e fracas bandas. Os demais primers produziram de 21 a 61 bandas com médias de 85% de polimorfismo (65,5 - 97), 0,33 de heterozigotidade (0,24 - 0,40) e 0,49 de índice de Shannon (0,35 - 0,57). Dos pares de primers desenhados, ME_4 apresentou os menores valores e o ME_8 os maiores para todos os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: IRAP, *Manihot esculenta*, polimorfismo, retrotransposon

Introdução

A cultura da mandioca apresenta grande variabilidade genética, pois manteve ativa a reprodução sexual, embora por interferência humana tenha sido propagada vegetativamente, resultando em cultivos policlonais (Silva et al., 2001). Devido a isso, uma população em mandioca é representada por muitas variedades locais cultivadas pelos agricultores, que



colaboram para o enriquecimento dos bancos de germoplasma. A caracterização e avaliação do germoplasma de mandioca tornam-se fundamentais para a utilização mais eficiente da coleção, e uma das ferramentas para aumentar o poder de resolução da análise da variabilidade genética tem sido os marcadores moleculares. Os retrotransposons são comuns em vários genomas. Gbadegesin et al. (2008) relataram a presença de algumas famílias de elementos transponíveis em mandioca. Os marcadores com base em retrotransposons (IRAP - *Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) são indicados devido às suas qualidades de reprodutibilidade, polimorfismo abundante, fácil visualização em uma única corrida em gel e ampla cobertura do genoma. O objetivo deste trabalho foi desenvolver primers para IRAP em mandioca.

Material e Métodos

As sequências de retrotransposons do tipo LTR (*Long Terminal Repeat*) foram localizadas no banco genômico de plantas Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) e as LTR foram identificadas com o auxílio do software LTR_FINDER (http://tlife.fudan.edu.cn/ltr_finder/). Oito retrotransposons denominados de ME_1 a ME_8 foram selecionados e para cada um foi desenhado um par de primer a partir da sequência das LTRs utilizando o software *Primer3* v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A otimização e validação da técnica IRAP foi realizada com base em 21 plantas (12 de Anori/AM, 6 Anamã/AM e 3 do Estado da Bahia) do Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental. A extração de DNA genômico seguiu o método CTAB 2%, no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa. O volume final da reação foi de 20 μ L contendo 50 ng de DNA, tampão 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,55, 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e 0,01% Tween 20), 2 mM MgCl_2 , 0,5 μ M de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, e 1,5 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega, USA). As condições de amplificação foram: 1 ciclo a 92°C por 2 min; 40 ciclos de 92°C por 15 s; de 40 a 61°C (dependendo do primer) por 1 min; e 72°C por 2 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizados no transluminador (Loccus Biotecnologia, BRA). O polimorfismo foi detectado pela presença (1) ou ausência (0) do produto de PCR. O percentual de loci polimórficos, heterozigosidade esperada (***h**) e o Índice de informação de Shannon (***I**) foram calculados usando o software PopGene 1.31 (Yeh et al. 1999).

Resultados e Discussão

Dos primers desenhados, dois deles (ME_1 e ME_3) produziram seis bandas e devido ao baixo número de amplicons, foram excluídos da análise. Os demais geraram de 21 a 61 bandas, com tamanho entre 100 e 12000 pb, com médias de 85% de polimorfismo (65,5% - 97%), 0,33 de heterozigosidade (0,24 - 0,40) e 0,49 de índice de Shannon (0,35 - 0,57). O primer ME_4 apresentou os menores valores e o ME_8 os maiores para todos os parâmetros avaliados (Tabela 1). Guo et al. (2006) encontraram 86% de polimorfismo com primers IRAP e REMAP em caquizeiros (*Diospyros kaki* Thunb), muito similar ao resultado encontrado aqui. Branco et al. (2007) encontraram 96% de polimorfismo em arroz com combinações entre quatro pares de primers IRAP e seis primers SSR. Em mandioca, Mühlen et al. (2000) obtiveram 69,40% de polimorfismo por AFLP e 55,80% com RAPD ao avaliarem a variabilidade genética de 54 etnovarietades, demonstrando que os marcadores IRAP foram informativos.

O índice de Shannon variou com o tamanho da amostra, sendo que o ME_8 sofreu menor efeito do tamanho da amostra. A amostra de Anori (n= 12) apresentou o mesmo grau de informação que a amostra total, mostrando que estes primers são eficientes com poucas plantas. A amostra da Bahia (n=3) apresentou menos informação, mas o ME_8 ainda encontrou 80% da informação, confirmando sua eficiência. Tanto no índice de Shannon como nas porcentagens de polimorfismo, houve influência do tamanho da amostra nas estimativas (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos loci IRAP amplificadas com cada par de primers em mandiocas mantidas no BAG da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas. *Nº. **bandas** – Número de bandas polimórficas, ***h** – diversidade genética de Nei, ***I** - Índice de informação de Shannon, % **poli** - porcentagem de loci polimórficos.

Primer	Tamanho (pb)	Local	No. plantas	*Nº. bandas	*h ± DP	*I ± DP	% poli
ME_2	200 - 4000	Anori	12	24	0,37 ± 0,15	0,54 ± 0,19	92,3
		Anamã	6	18	0,28 ± 0,20	0,41 ± 0,29	69,2
		Bahia	3	08	0,14 ± 0,21	0,20 ± 0,30	30,7
		Total	21	50	0,38 ± 0,15	0,55 ± 0,20	92,3
ME_4	100 - 5000	Anori	12	17	0,22 ± 0,20	0,33 ± 0,29	58,6
		Anamã	6	14	0,20 ± 0,22	0,29 ± 0,31	48,3
		Bahia	3	05	0,08 ± 0,17	0,11 ± 0,24	17,2
		Total	21	36	0,24 ± 0,20	0,35 ± 0,29	65,5
ME_5	150 - 4000	Anori	12	17	0,26 ± 0,21	0,38 ± 0,29	68
		Anamã	6	16	0,25 ± 0,21	0,37 ± 0,30	64
		Bahia	3	09	0,16 ± 0,23	0,22 ± 0,31	36
		Total	21	42	0,29 ± 0,20	0,42 ± 0,28	76

		Anori	12	18	0,25 ± 0,18	0,38 ± 0,26	75
ME_6	150 - 1800	Anamã	6	09	0,13 ± 0,18	0,20 ± 0,27	37,5
		Bahia	3	09	0,17 ± 0,22	0,24 ± 0,31	37,5
		Total	21	36	0,26 ± 0,17	0,40 ± 0,23	83,3
ME_7	200 - 3000	Anori	12	13	0,22 ± 0,20	0,33 ± 0,28	62
		Anamã	6	15	0,26 ± 0,19	0,39 ± 0,27	71,4
		Bahia	3	07	0,15 ± 0,21	0,21 ± 0,31	33,3
		Total	21	35	0,26 ± 0,18	0,40 ± 0,24	81
ME_8	100 - 12000	Anori	12	52	0,35 ± 0,18	0,51 ± 0,25	85,2
		Anamã	6	56	0,36 ± 0,14	0,53 ± 0,19	92
		Bahia	3	44	0,32 ± 0,20	0,46 ± 0,29	72
		Total	21	152	0,40 ± 0,10	0,57 ± 0,14	97

Conclusão

O marcador IRAP mostrou-se eficiente para avaliar a diversidade genética do germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental, considerando a excelente percentagem de polimorfismo observada.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo e à FAPEAM (Proc. No. 10766.EPE350.10768.30032012) pelo apoio financeiro. À Embrapa pelo acesso ao germoplasma. À Profa. Dra. Doriane Picanço Rodrigues da UFAM, pela colaboração com o uso dos programas para análise dos dados.

Referências Bibliográficas

- BRANCO, C.J.S.; VIEIRA, E.A.; MALONE, G.; KOPP, M.M.; MALONE, E.; BERNARDES, A.; MISTURA, C.C.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, C.A. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. **Journal Appl Genet**, v.48, p.107-113, 2007.
- GBADEGESIN, M.A.; WILLS, M.A.; BEECHING, J.R. Diversity of LTR-retrotransposons and *Enhancer/Suppressor Mutator*-like transposons in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Mol Genet Genomics**, v.280, p.305–317, 2008.
- GUO, D.; ZHANG, H.; LUO, Z. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. **Plant Science**, v.170, p.528–533, 2006.
- MUHLLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p.319-328, 2000.



SILVA, R.M.; BANDEL, G.; FARALDO, M.I.F.; MARTINS, P.S. Biologia Reprodutiva de Etnovarietades de Mandioca. **Scientia Agricola**, v.58, p.101-107, 2001.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. PopGen v.1.31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. **Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research**, 1999. Acessado em 20 de Junho de 2012.