



XV CONGRESSO
BRASILEIRO DE
MANDIOCA
BAHIA 2013

Inovação e sustentabilidade:
da raiz ao amido

21 A 25
OUTUBRO DE 2013

BAHIA OTHON PALACE HOTEL
SALVADOR/BA



ANÁLISE FENÉTICA DE CULTIVARES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) COM ALTOS TEORES DE BETA- CAROTENO UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.

Danilo Rocha Velame¹, Edímille Vivian Batista Menezes Ramalho¹, Eder Jorge Oliveira², Vanderlei da Silva Santos², Claudia Fortes Ferreira².

¹Bolsista IC Embrapa Mandioca e Fruticultura, Laboratório de Biologia Molecular, danilexvel@hotmail.com, viih_viih@hotmail.com;

²Pesquisador Embrapa Mandioca e Fruticultura, Laboratório de Biologia molecular, eder.oliveira@embrapa.br, vanderlei.silva-santos@embrapa.br, claudia.ferreira@embrapa.br

Introdução

A mandioca é uma das culturas de maior consumo alimentar em todo Brasil. O país é o terceiro maior produtor mundial de mandioca, cuja produção em 2011 foi de aproximadamente 25 milhões de toneladas cultivada em 1,7 milhões de ha (FAOSTAT, 2013). No Brasil, a região Nordeste se destaca entre as demais, com produção em torno de 8 milhões de toneladas (IBGE, 2013). Além do seu uso na indústria do amido e produção de farinha, a mandioca também é apreciada como fonte de carboidratos, com grande variabilidade genética para a concentração dos nutrientes em suas raízes.

Dentre esses nutrientes, os carotenoides, principalmente o beta-caroteno, são especialmente importantes por servirem como precursores da vitamina A. O teor desse componente pode variar de 4 a 10 µg/g de raiz fresca em algumas raízes de coloração creme/amarela pertencentes a acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre acessos de mandioca contrastantes para coloração de raízes amarela e brancas, teores de matéria seca, produtividade e resistência a pragas por meio de marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*) para uso no melhoramento genético que visa ao desenvolvimento de raízes de mandioca com altos teores de beta-caroteno, bem como averiguar a capacidade desses marcadores de separar os genótipos em grupos com base nos teores de beta-caroteno.

Material e métodos

Material genético

Foram avaliados 20 acessos de mandioca contrastantes para raízes com coloração amarela e brancas, teores de matéria seca, produtividade e resistência a pragas e doenças,



pertencentes ao BAG-Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, a citar: a) raízes amarelas: BGM0878, BGM1456, BGM1140, BGM0991, BGM0949, BGM0061, BGM1711, BGM1705, BGM1704, BGM0893; e b) raízes brancas: BGM1735, BGM0587, BGM0021, Formosa, Kiriris, Fécula Branca, Verdinha, 9655-02, 98150-06 e BGM1660.

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. Após a quantificação, a concentração das amostras foi ajustada para 2,5 ng.µL⁻¹ por meio da diluição destas em tampão TE (Tris-EDTA), a fim de realizar as reações de PCR.

Amplificação de DNA

As amplificações seguiram a metodologia do protocolo descrito por Williams et al. (1990). Um total de 18 *primers* SSRs foram testados (5 monomórficos e 13 polimórficos). Os 13 *primers* polimórficos foram utilizados em reações de PCR contendo os seguintes reagentes: 10 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada dNTPs, 0,2µM de cada primer (F e R) e 1,0 U de *Taq* em tampão 10x (Biosystems) em volume final de 15 µL.

Os seguintes ciclos foram utilizados para a amplificação em termociclador MyCycler Thermocycler (BioRad): 94 °C por três minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por um minuto, x°C (dependendo da Ta de cada *primer*: 45 a 55° C) por 45 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 3% (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 etídeo (0,5 mg.mL⁻¹), visualizado em transiluminador com luz UV (UVITEC, Modelo SXT 40 M) e fotografado em sistema fotodocumentação (Vilber Lourmat).

Análise fenética

A diversidade genética dos genótipos foi determinada por meio do índice de alelos compartilhados utilizando-se o tamanho em pb dos alelos e o software POWERMARKER (Liu e Muse, 2005). O dendrograma foi obtido utilizando-se a análise de agrupamento pelo



XV CONGRESSO
BRASILEIRO DE
MANDIOCA
BAHIA 2013

Inovação e sustentabilidade:
da raiz ao amido

21 A 25
OUTUBRO DE 2013

BAHIA OTHON PALACE HOTEL
SALVADOR/BA



método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) e o software package do programa STATISTICA (Statistica, 2002).

Resultados e discussão

Um exemplo do perfil eletroforético dos genótipos de mandioca em gel de agarose utilizando-se o marcador SSRY103 é apresentado na Figura 1. No geral observou-se boa visualização dos fragmentos em géis de agarose.

De acordo com os valores de PIC, os *primers* com maior poder informativo foram o SSRY106, SSRY34, SSRY168, EME189 e SSRY103, com valores de PIC de 0,53, 0,57, 0,61, 0,65 e 0,72, respectivamente.

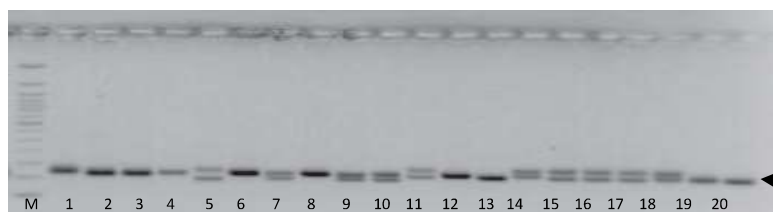


Figura - 1: Perfil eletroforético de 20 genótipos de mandioca contrastantes para coloração de raízes (amarela e brancas), teores de matéria seca, produtividade e resistência a pragas (1-20) utilizando o marcador SSRY 103. M = marcador de 50 pb – ladder (Invitrogen). Seta – padrão de bandamento.

No total foram identificados 44 alelos, que então foram utilizados para gerar o dendrograma (Figura 2).

A maior distância genética entre os 20 genótipos analisados foi de 0,81 entre os acessos BGM0893 e BGM0949 e a menor, 0,19 entre os genótipos BGM1711 e BGM1705. De modo geral, não foi observada associação entre cor de raízes e distancia genética, considerando que os genótipos mais contrastantes possuem a mesma cor de raízes (branca). Estas observações indicam a necessidade de analisar um número maior de locos de microssatélites para que sejam observadas correlações mais fortes entre as marcas e o teor de carotenoides.

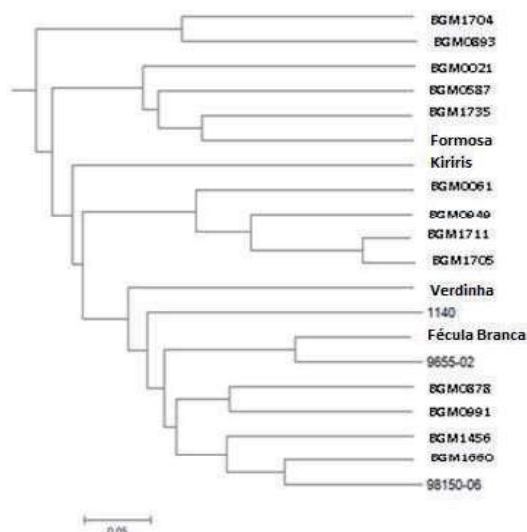


Figura - 2: Dendrograma gerado por meio de 44 alelos provenientes de marcadores SSR para 20 genótipos de mandioca. Utilizou-se o índice de alelos compartilhados e o método de agrupamento de UPGMA.

O trabalho conduzido por Ferreira et al. (2008), utilizando marcadores RAPD e diferentes variedades de mandioca, demonstrou haver diversidade genética suficiente dentro das mandiocas de raízes amarelo-laranja a ser explorada dentro do programa de melhoramento da espécie, corroborando com os resultados encontrados em nosso trabalho.

Embora no atual trabalho os marcadores não tenham indicado alta associação com teor de carotenoides, as informações geradas com os marcadores testados nesse estudo permitem direcionar cruzamentos entre acessos contrastantes, como por exemplo, BGM0893 e BGM0949, que apresentaram a maior distância genética. Essas informações servirão de base para o cruzamento de genótipos dentro do programa de melhoramento de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura que visa ao desenvolvimento de variedades produtivas, resistentes às principais pragas e com altos teores de beta-caroteno.

Conclusões

Os marcadores microsatélites utilizados não são capazes de agrupar os acessos de mandioca com base no teor de carotenoides nas raízes, mas são importantes para identificar variabilidade genética, a qual é útil para uso de contrastes na realização de cruzamentos direcionados.



XV CONGRESSO
BRASILEIRO DE
MANDIOCA
BAHIA 2013

Inovação e sustentabilidade:
da raiz ao amido

21 A 25
OUTUBRO DE 2013

BAHIA OTHON PALACE HOTEL
SALVADOR/BA



Agradecimentos

À Embrapa pelo financiamento do projeto.

Referências

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

FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>, acessado em agosto de 2013.

FERREIRA, C.F.; ALVES, E.; PESTANA, K. N.; JUNGHANS, D.T.; KOBAYASHI, A.K. Molecular characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** v. 8, p. 23-29, nov., 2008.

IBGE, <http://www.ibge.gov.br/home/> acessado em agosto de 2013.

LIU, K.; MUSE, S. V. Powermarker. Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2128-2129, 2005.

STATISTICA FOR WINDOWS. 2002. Computer program manual. Version 6. Tulsa: Statsoft, 1CD-ROM.

WILLIAMS, J. K. G.; KUBELI, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.