

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE VARIEDADES DE MANDIOCA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES*

Lívia de Jesus VIEIRA¹, Alfredo Augusto Cunha ALVES², Pâmela Santana DALTRO³

RESUMO: A diversidade genética da mandioca tem sido caracterizada em termos de variedades cultivadas em cerca de 7000 variedades encontradas em todo o mundo. Os marcadores moleculares possibilitam várias aplicações e análises genéticas com grandes oportunidades de utilização no melhoramento genético. O objetivo deste trabalho foi analisar locos SSR e estimar a distância genética entre variedades de mandioca. Foram selecionadas 32 variedades de mandioca provenientes do Banco de Germoplasma do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). A amplificação do DNA foi realizada com 36 *primers* microssatélites disponibilizados pelo CIAT. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%. Foi estimada a similaridade genética entre as variedades de mandioca de acordo com Nei (1972). O método usado para realizar a análise de agrupamento foi feita com base na matriz de dissimilaridade UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Os cálculos foram realizados no programa NTSYS. Todos os *primers* avaliados foram polimórficos e amplificaram um total de 320 alelos com uma média de 8,9 alelos por loco. O coeficiente de dissimilaridade usado para calcular a distância genética entre as 32 variedades de mandioca variou de 0,23 a 0,91. A distância genética mais alta foi observada entre as variedades CM3306-9 e BRA 165, enquanto a distância genética mais baixa foi entre as variedades BRA 1142 e BRA 114. Pode-se concluir que o marcador SSR serve como uma eficiente ferramenta no estudo da diversidade genética entre as variedades de mandioca estudadas.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*, divergência genética, SSR

SUMMARY: DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY IN VARIETIES OF CASSAVA BY MICROSATELLITE MARKERS. The genetic diversity of cassava has been characterized in terms of varieties by about 7,000 accessions found all over the world. The molecular markers allow various

* Trabalho financiado pelo Generation Challenge Programme (GCP), Embrapa e CAPES

¹ Pós-Graduação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA - liviabiol@gmail.com

² Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMT), CP 007, 44380-00, Cruz das Almas, BA - aalves@cnpmf.embrapa.br

³ Graduanda da Faculdade Maria Milza (FAMAM), Cruz das Almas, BA – pamalpinista@hotmail.com

applications and genetic analyses with great opportunities for use in breeding. The objective of this work was to analyze SSR loci and to estimate the genetic distance among varieties of cassava. We selected 32 cassava varieties coming from the Germplasm Bank of the International Center for Tropical Agriculture (CIAT). DNA amplification of DNA was performed using 36 microsatellite primers provided by CIAT. Products of amplification were separated by polyacrylamide gel electrophoresis 5%. Genetic similarity among cassava varieties was estimated according to Nei (1972). The cluster analysis was based on UPGMA dissimilarity matrix. The calculations were performed using NTSYS software. All primers were polymorphics and amplified 320 alleles with an average of 8.9 alleles per locus. The dissimilarity coefficient used to calculate the genetic distance among the 32 varieties of cassava ranged from 0.23 to 0.91. The highest genetic distance was observed between the varieties CM3306-9 and BRA 165, while the lowest genetic distance was between the varieties BRA 1142 and BRA 114. It can be concluded that the SSR markers serve as an efficient tool for studying genetic diversity among the varieties of cassava studied.

Keywords: *Manihot esculenta*, genetic diversity, SSR

INTRODUÇÃO

O conhecimento relacionado à diversidade genética das espécies traz duas vantagens a um programa de melhoramento. A primeira diz respeito à heterogeneidade genética que limita a vulnerabilidade das espécies às pragas e doenças e a segunda está relacionada ao fornecimento de um amplo suprimento de variação alélica que pode ser usada para criar novas combinações de genes favoráveis (Van Esbroeck and Bowman, 1998). A diversidade genética da mandioca tem sido caracterizada em termos de variedades cultivadas em cerca de 7000 acessos encontradas em todo o mundo, em sua maioria etnovarietades ("folk varieties"), mantidas por agricultores tradicionais (Hershey, 1994; Emperaire et al., 1998).

Estudos mais detalhados, em função de características morfológicas, caracteres agrônômicos e bioquímicos, isoenzimas e marcadores de DNA, quantificaram e mostraram alguns aspectos da distribuição da variabilidade genética da cultura (Colombo et al.; 1998; Carvalho et al., 1998; Sambatti, 1998).

Os marcadores moleculares possibilitam várias aplicações e análises genéticas com grandes oportunidades de utilização no melhoramento genético. Esses marcadores apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos, dentre elas, destacam-se o polimorfismo, a independência entre os efeitos ambientais e o estágio fisiológico da planta. Desses marcadores, os microssatélites, também denominados SSR (*Simple Sequence Repeat*), possibilitam ampla utilização nos programas de melhoramento (Reddy et al., 2001). A disponibilidade e abundância desses marcadores ao longo do genoma, sua natureza polimórfica, co-dominância e por serem baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), os fazem bastante úteis em estudos de diversidade genética de mandioca.

Com o intuito de se ter um conhecimento mais aprofundado da diversidade genética de algumas variedades de mandioca, o presente trabalho teve como objetivos analisar loci de SSRs e estimar a distância genética entre as 32 variedades de mandioca.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a determinação da diversidade genética foram selecionadas 32 variedades mandioca do Banco de Germoplasma do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Apesar do pouco número de genótipos para uma análise de diversidade, as 32 variedades foram selecionadas dentro de um grande número de variedades como aquelas com maiores níveis de contraste (tolerante e suscetível) para tolerância as condições de prolongada deficiência hídrica. Portanto, o critério de seleção foi com base em estudos de avaliações previamente realizados nos programas de melhoramento da Embrapa e CIAT. A extração de DNA das amostras seguiu o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998) com algumas modificações. Na amplificação do DNA foram utilizados 36 *primers* microssatélites de mandioca disponibilizados pelo CIAT. As reações foram realizadas em 16 µL de solução contendo 10 ng de DNA genômico, tampão 1X, 2,5-3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada primer e uma unidade de enzima Taq DNA polimerase. O programa de amplificação contou com as seguintes etapas: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e polimerização a 72°C por dois minutos, e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72°C e, finalmente, mantidas a 4°C até sua retirada do termociclador. Os produtos de amplificação foram

separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, contendo uréia, água mili-Q, TBE 10 X, bis: acrilamida, TEMED e persulfato de amônio.

Os fragmentos de DNA amplificados foram computados como presença ou ausência de bandas (0 e 1, respectivamente). Apenas as bandas polimórficas foram utilizadas na avaliação. Foi estimada a similaridade genética entre as variedades de mandioca de acordo com Nei (1972). O método usado para realizar a análise de agrupamento feita com base na matriz de dissimilaridade do tipo hierárquico UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Os cálculos foram feitos usando o programa NTSYS (Rohlf, 1992).

A eficiência do método de agrupamento foi avaliada através do coeficiente de correlação cofenética, observando a concordância entre a matriz de dissimilaridade original e o dendograma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 36 *primers* avaliados foram altamente polimórficos e amplificaram um total de 320 alelos com uma média de 8,9 alelos por loco. Houve uma variação de 3 a 17 alelos por *primer* e os mais informativos no agrupamento UPGMA foram os *primers* SSRY 19, SSRY 51, SSRY 181 e o SSRY 164. Mühlen et al (2000) em estudos da variabilidade genética em etnovarietades de mandioca avaliada por marcadores microsatélites, obteve 97,96% de *primers* polimórficos e uma média geral de 4,5 alelos por loco. Faraldo et al (2000) utilizando marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas constatou a existência de 15 locos polimórficos, 37 alelos e a identificação de 60 padrões fenotípicos em 141 amostras de etnovarietades de mandioca. Neste trabalho foi observado um número superior de alelos e polimorfismo do que os apresentados pelos autores provavelmente pela maior divergência genética entre as variedades de mandioca avaliadas.

O coeficiente de dissimilaridade usado para calcular a distância genética entre as 32 variedades de mandioca variou de 0,23 a 0,91. A distância genética mais alta (0,91) foi observada entre as variedades CM3306-9 e BRA 165, enquanto a distância genética mais baixa foi entre as variedades BRA 1142 e BRA 114 (Figura 1).

As correlações cofenéticas entre os dados de dissimilaridade e as matrizes fenéticas obtidas pelos métodos UPGMA foi igual a 70% ($r = 0.70394$) o que aumenta a confiabilidade do dendograma

onde se observou a formação de 6 grupos distintos cortados pela linha vertical tracejada calculada a partir da média da matriz de similaridade (Figura 1).

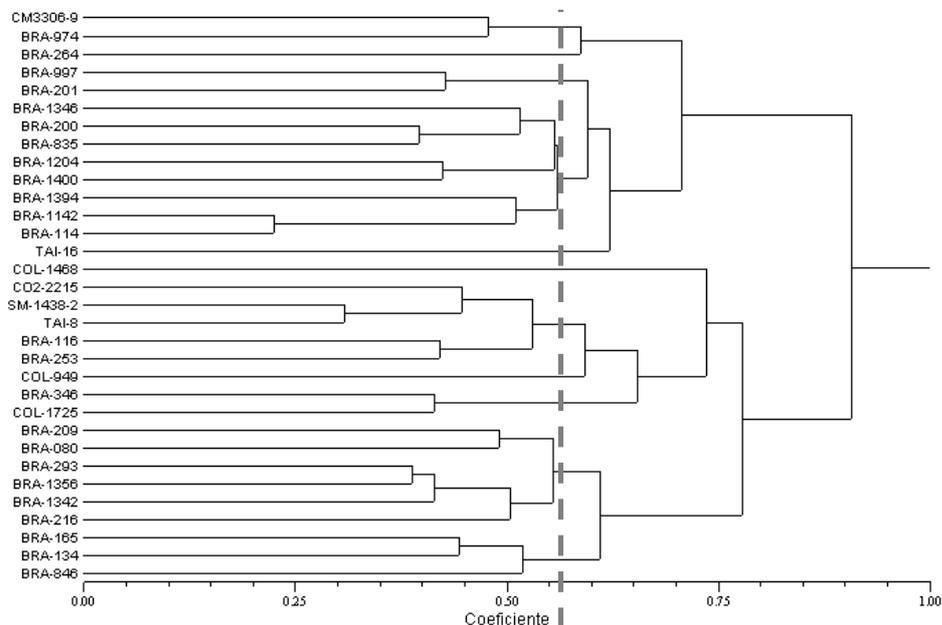


Figura 1 – Dendrograma construído com base nas medidas de dissimilaridade e usando o método das médias das distâncias (UPGMA).

CONCLUSÕES

- 1) Pode-se concluir que o marcador SSR serve como uma eficiente ferramenta no estudo da diversidade genética entre os acessos de mandioca estudados.
- 2) Esses resultados poderão direcionar a seleção de genótipos nos programas de melhoramento de mandioca servindo de subsídio no conhecimento do grau de variabilidade genética disponível entre os acessos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, L.J.C.B.; SCHAAL, B.A.; FUKUDA, W.M.G. Phenetic relationships and genetic diversity among cassava (*Manihot esculenta* Crantz) land races revealed by PCR-based markers. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p.14, 1998.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T.L.; CHARRIER, A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.105-113, 1998.

- FARALDO, M. I. F; SILVA, R. M; ANDO, A; MARTINS, P. S. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.499-505, jul./set. 2000
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Embrapa. 3ªed. Brasília: p.220,1998.
- HERSHEY, C.H. **Manihot genetic diversity**. In: **International network for cassava genetic resources**. International Crop Network Series (IPGRI), v.10, p.111-134, 1994.
- NEI, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. Proceedings of the National Academy of Sciences from the USA, v.70, p.3321-3323, 1973.
- REDDY, O.U.; PEPPER, A.E., ABDURAKHMONOV, I., SAHA, S., JENKINS, J.N., BROOKS, T., BOLEK, Y., ELZIK, K.M. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **Crop Sci**. v. 5, p.103-113, 2001.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Applied Biostatistics, 1992. 237p.
- SAMBATTI, J. B. M. **Erosão genética e conservação de germoplasma de mandioca na agricultura autóctone em Ubatuba-SP. Piracicaba**, 1998. 165p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- VAN ESBROECK, G.A; BOWMAN, D.T, CALHOUN, D.S., MAY, O.L. Changes in the genetic diversity of cotton in the USA from 1970 to 1995. **Crop Sci**. v.38, p. 33-37, 1998.
- MUHLEN, G. S. MARTINS, P. S. ANDO, A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca avaliada por marcadores moleculares de DNA. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.319-328, abr./jun. 2000.