

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE MACAXEIRA DO BAG DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Girena Fernandes Ramalho¹, Elisa Ferreira Moura², Carlos Rogério de Sousa Silva³, Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque⁴, Lígia Cristine Gonçalves Pontes⁵, Leonária Silva Souza⁶

¹Graduanda em Ciências Biológicas, UFPA, Bolsista ITI-A CNPq, e-mail: girenaufpa@yahoo.com.br

²Pesquisador A, Dra. em Genética e Melhoramento, Embrapa Amazônia Oriental, e-mail: elisa@cpatu.embrapa.br;

³Pesquisador, Dr. em Biologia na Agricultura e no Ambiente, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), e-mail: carlos-roger@hotmail.com

⁴Pesquisador, Dr. em Fitopatologia, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), e-mail: psbalbuq@oi.com.br

⁵Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Bolsista Embrapa, lilikbiologia@hotmail.com

⁶Assistente A, Química, Embrapa Amazônia Oriental, e-mail: leonaria@cpatu.embrapa.br.

Introdução

A região Norte do Brasil é conhecida pela exploração da capacidade da mandioca pelos seus agricultores sendo também considerada região de origem da espécie. As mandiocas são classificadas em mandiocas doces, também conhecidas como macaxeiras, aipim ou mandioca mansa, muito utilizadas no consumo humano, e mandiocas bravas, ou amargas, geralmente usadas nas indústrias. As macaxeiras são caracterizadas por conter menos de 100 ppm ou 100 mg de ácido cianídrico (HCN) por quilograma de polpa crua de raízes, o que possibilita o consumo com pouco processamento.

O Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Oriental representa a base do programa de melhoramento genético para o Estado do Pará, pois é a partir das avaliações dos materiais nele contidos que selecionam-se materiais para testes mais avançados no Estado. A base do BAG da Instituição é composta por materiais coletados em propriedades de agricultores familiares, principalmente no estado do Pará. Para melhor aproveitamento desse BAG, é importante gerar informações acerca de sua variabilidade genética, e verificar se o BAG tem variação genética satisfatória para os diferentes grupos de mandioca existentes, como no caso das macaxeiras. Os marcadores moleculares vêm sendo bastante utilizados para essa função, em especial os microssatélites, pelo seu polimorfismo e confiabilidade (PEREIRA & PEREIRA, 2006)

O objetivo deste estudo foi analisar a variabilidade genética de 84 acessos de macaxeira do Banco de germoplasma da Embrapa Amazônia oriental, utilizando marcadores microssatélites.

Material e Métodos

Foram selecionados 84 acessos de macaxeira pertencentes ao Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Oriental. A extração de DNA seguiu o protocolo de DOYLE & DOYLE (1990), com modificações. O DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% usando DNA lambda em diferentes concentrações como padrão. Na amplificação do DNA, foram utilizados nove *primers* de microssatélites de mandioca: GA126, GA131 e GA136 desenvolvidos por CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al. (1998) e SSRY 04, SSRY 09, SSRY 164, SSRY 19, SSRY 20 e SSRY 21, desenvolvidos por MBA et al. (2001), avaliados por fluorescência usando a abordagem de *primer-tail* (LANAUD et al. 1999, PUGH et al. 2004), por eletroforese capilar. Para amplificação do DNA, as reações de PCR foram preparadas com volume final de 13 µl, contendo 15ng de DNA genômico; 100 µM de cada dNTP; 0,2 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*); tampão da enzima (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl₂) e 1 U de Taq DNA polimerase. As reações foram amplificadas em termociclador, segundo MBA et al. (2001). As amostras foram submetidas à eletroforese capilar, utilizando o analisador automático de capilar ABI PRISM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As corridas foram analisadas pelo programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems). A caracterização molecular (DNA *fingerprint*) foi tabulada em planilha de dados, tipo ODF (BrOffice.org Calc).

As análises foram realizadas no programa Genes (CRUZ, 2001) considerando o índice ponderado para marcadores co-dominantes/multialélicos para obtenção das dissimilaridades. A matriz de dissimilaridades foi utilizada para gerar o dendrograma pelo método UPGMA. Foram calculados parâmetros de diversidade genética, como número de alelos, média de alelos por loco, heterozigidade média esperada e observada.

Resultados e Discussão

Os nove *primers* avaliados amplificaram 58 alelos, com média de 6,44 alelos/loco. Houve variação de 3 (GA 136) a 9 alelos (SSRY 19) por *primer*. A heterozigidade esperada média foi de 0,72, com variação de 0,60 (GA136) a 0,79 (SSRY19). Esse valor médio foi superior ao encontrado por outros autores para grupos de macaxeiras coletados em outras regiões do Brasil (Elias et al., 2004; Peroni et al., 2007). Isso pode estar relacionada ao fato da maioria das coletas ter sido realizada na região Amazônica, que é considerada a região de origem da mandioca. A heterozigidade média observada foi de 0,74, com variações de 0,56 (SSRY21) a 0,9 (GA126). A alta heterozigidade observada costuma ser comum em mandioca, pela sua característica de geração de novos genótipos por reprodução cruzada e propagação vegetativa.

As dissimilaridades genéticas variaram de 0,0 a 0,94. A maior dissimilaridade genética

ocorreu entre uma macaxeira de Santa Luzia, Pará (M. Santa Luzia 2) e uma macaxeira coletada em Dom Eliseu, Pará (14 M. amarela). A divergência zero foi observada nos grupos de duplicatas: Grupo 1 (M. roxa AC, M. Sta Luzia e M. Roxa 02), grupo 2 (M. Najaica, M. Água Morna 10, M. Itu, M. Curuai e M. Água morna 15), grupo 3 (31 M. Arizoninha e M. Pão nove), grupo 4 (M. Amapá e M. Cacau Hans), grupo 5 (M 19 e M Manteiga AP), grupo 6 (05 M. Bahia e M. Branca AP), grupo 7 (M. Abaete e M. Cacau terra alta) e grupo 8 (M. Amarela 1, M Manteiga, 20 M. Amarelinha e M. Água morna). Em análise com mais *primers*, houve separação entre os acessos M.Itu e M. Curuai (Moura, comunicação pessoal), levando a concluir que talvez sejam necessários mais *primers* para diferenciar os demais acessos e confirmar a sua duplicidade.

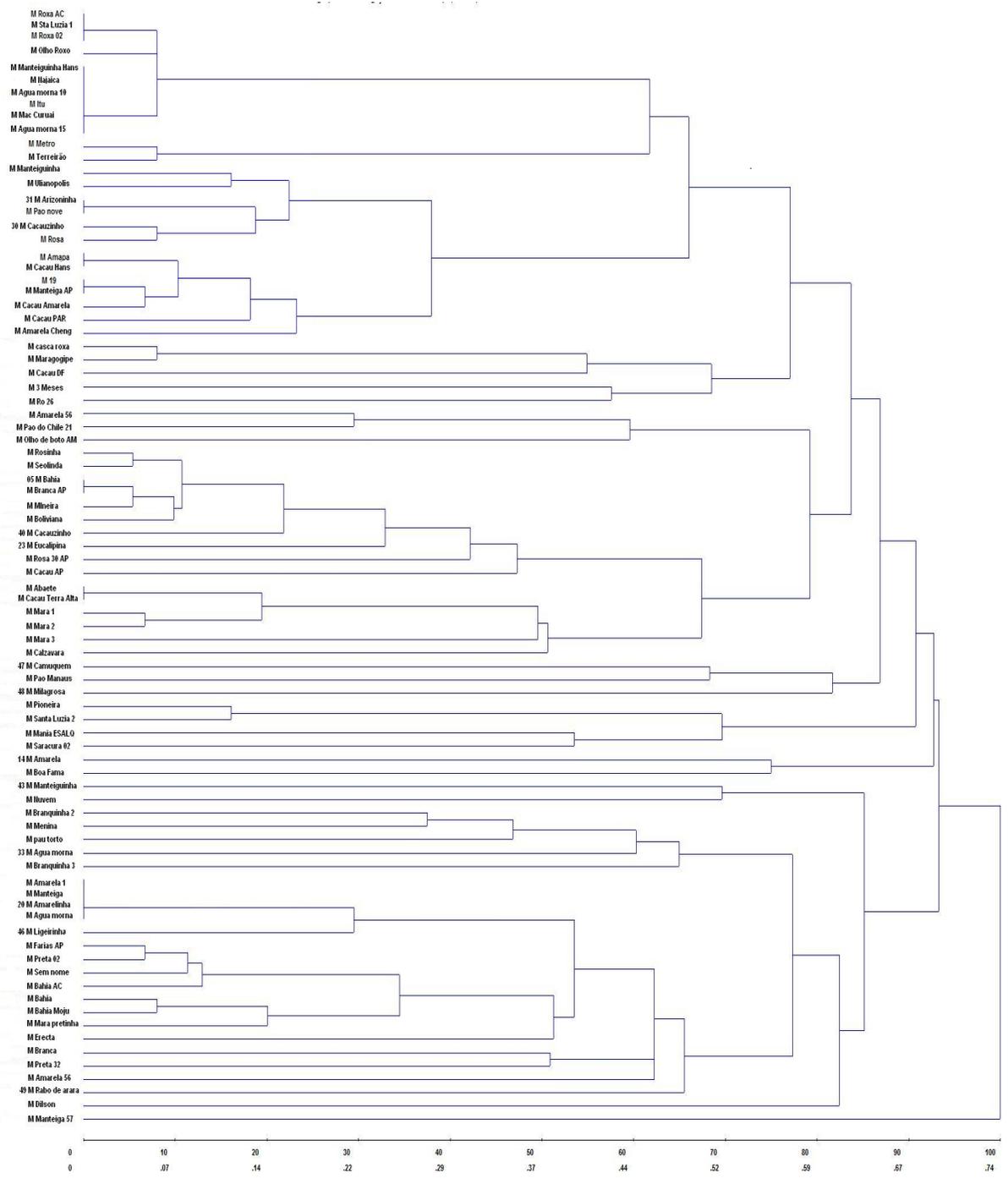


Figura 1. Dendrograma obtido gerado pelo método UPGMA e baseado nas distâncias genéticas entre 84 acessos de macaxeira genotipados com nove marcadores microsatélites.

Entretanto, os dados revelam que materiais geneticamente próximos vêm sendo mantidos por agricultores de diferentes regiões, pois a maioria das possíveis duplicatas foi coletada em locais distintos, até mesmo estados diferentes, como Pará e Amapá.

O dendrograma (Figura 1) mostrou que o acesso mais divergente foi o M. Manteiga 57, que não se agrupou com os demais. Esse acesso foi proveniente de Santarém, e mesmo havendo outros acessos da mesma localidade, não houve agrupamento com os mesmos.

A partir da construção do dendrograma e do estabelecimento da relação genética entre os acessos do BAG, será possível traçar estratégias de cruzamentos e selecionar melhor os acessos que comporão ensaios avançados para recomendação de variedades, já que se evitará utilizar acessos duplicados.

Conclusões

Existe variabilidade genética para o grupo de macaxeiras pertencentes ao Banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, e essa variabilidade está acima da relatada para esse grupo de mandiocas na literatura.

Referências Bibliográficas

- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.P.; MAYA, M.M.; BONIERBALE, M.W.; KRESOVICH, S.; FREGENE, M.A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.493-501, 1998.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 648 p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- ELIAS, M.; MUHLEN, G.S.; MCKEY, D.; ROA, A.C., TOHME, J. Genetic diversity of traditional South A-merican landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**, v.52, p.242-25, 2004.
- LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, v.8, p.2141-2143, 1999.
- MBA, R.E.C.; STEPHENSON, P.; EDWARDS, K.; MELZER, S.; NKUMBIRA, J.; GULLBERG, U.; APE, K.; GALE, M.; TOHME, J.; FREGENE, M. Simple sequence repeats (SSR) markers survey

of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.21-31, 2001.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S. Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas. In: In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006, p. 85-106.

PERONI, N.; KAGEYAMA, P.Y.; BEGOSSI, A. Molecular differentiation, diversity, and folk classification of “sweet” and “bitter” cassava (*Manihot esculenta*) in Caiçara and Caboclo management systems (Brazil). **Genetic resources and crop evolution**, v.54, p.1333-1349, 2007.

PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A.M.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N'GORAN, J.A.K.; LANAUD, C. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.1151-1161, 2004.