

# DUPLICATAS NO BANCO DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL DETECTADAS POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

Elisa Ferreira Moura<sup>1</sup>, João Tomé de Farias Neto<sup>1</sup>, Girena Fernandes Ramalho<sup>2</sup>, Diehgo Tuloza da Silva<sup>3</sup>, José Edson Sampaio<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador A, Dr. em Genética e Melhoramento, Embrapa Amazônia Oriental, e-mail: [elisa@cpatu.embrapa.br](mailto:elisa@cpatu.embrapa.br); [tome@cpatu.embrapa.br](mailto:tome@cpatu.embrapa.br).

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, UFPA, Bolsista ITI-A CNPq, e-mail: [girenaufpa@yahoo.com.br](mailto:girenaufpa@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Biólogo, e-mail: [dbiotuloza@hotmail.com](mailto:dbiotuloza@hotmail.com)

<sup>4</sup>Assistente A, Engenheiro Agrônomo, Embrapa Amazônia Oriental, e-mail: [edsons@cpatu.embrapa.br](mailto:edsons@cpatu.embrapa.br).

## Introdução

A base do BAG de mandioca mantido no Pará são materiais provenientes de propriedades de agricultores familiares do Estado. Atualmente, o BAG conta com 470 acessos, incluindo acessos de mandioca brava, mandioca doce ou macaxeira e mandioca açúcarada. Os acessos vêm sendo caracterizados quanto a 39 descritores morfo-agronômicos previamente estabelecidos (FUKUDA & GUEVARA, 1998). A partir dessa caracterização, vem-se verificando que alguns acessos, inclusive com denominações diferentes e coletados em diferentes locais, são morfo-agronomicamente semelhantes, podendo se constituir em duplicatas. A identificação de duplicatas em bancos de germoplasma é interessante para reduzir o tamanho do banco, o que facilita e dinamiza o seu manejo.

A principal forma de se identificar duplicatas é pela genotipagem molecular, já que os marcadores moleculares representam porção do genoma que não sofre influência ambiental, além de amostrar regiões aleatórias do genoma. Os marcadores microssatélites, pela grande quantidade de informação que geram por loco, vêm sendo utilizados na identificação de duplicatas em bancos de germoplasma e populações de diferentes espécies (ROBICHAUD et al. 2006, van TREUREN et al. 2010).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi genotipar molecularmente acessos de mandioca identificados como morfo-agronomicamente semelhantes usando marcadores microssatélites.

## Material e Métodos

Foram selecionados 36 acessos do Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Oriental, dos quais 41 pares de acessos apresentavam semelhança morfo-agronômica, e foram divididos em 13 grupos de semelhança (Tabela 1). Os acessos selecionados continham 16 amostras de macaxeiras ou mandioca doce, diferenciados pela letra “M” e 20 amostras de mandioca brava. Nos grupos de semelhança em que foram coletados acessos no mesmo município, os mesmos foram coletados em propriedades diferentes. O DNA genômico total foi extraído pelo método de DOYLE & DOYLE (1990) com modificações a partir de folhas jovens. O DNA foi quantificado em gel de agarose a 1%, usando amostras de DNA do fago lambda em diferentes concentrações como padrões. O DNA foi diluído para 10ng.µl<sup>-1</sup>. Foram utilizados 15 *primers* microssatélites: GAGG05, GA21, GA126, GA131 e GA136, desenvolvidos por CHAVARRIAGA-AGUIRE et al. (1998) e SSR04, SSR09, SSR19, SSR20, SSR21, SSR63, SSR82, SSR102 e SSR106, desenvolvidos por MBA et al. (2001) para ter maior probabilidade da identificação de duplicatas. As reações de PCR foram preparadas para volume final de 20 µl. Os produtos da amplificação foram separados em eletroforese vertical, usando gel de poliacrilamida a 6%. Os géis foram revelados com nitrato de prata e escaneados para análise das imagens. Foi realizada a interpretação visual dos géis, onde cada *primer* representou um loco e cada banda com diferente padrão de migração nos géis foi considerada um alelo. 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. Foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de similaridades genéticas e a matriz dos valores cofenéticos, para verificar a consistência dos agrupamentos. Com a frequência dos alelos obtida para cada loco, foi calculada a probabilidade de identidade genética, que é a probabilidade de que dois indivíduos ao acaso compartilhem o mesmo genótipo com os locos utilizados (PAETKAU & STROBECK, 1994).

### **Resultados e Discussão**

Alta variabilidade genética foi encontrada para os acessos de mandioca avaliados. Os 15 locos microssatélites utilizados foram 100% polimórficos e amplificaram ao todo 75 alelos, com média de cinco alelos por loco. O número de alelos variou de dois (GAGG05 e SSR102) a oito (SSR04). A heterozigosidade média esperada, uma medida de diversidade genética, variou de 0,80 (GA131) a 0,45 (SSR102), com média de 0,66. A heterozigosidade média observada também foi elevada (0,63), o que costuma ser comum em mandioca, pela sua característica de geração de novos genótipos por reprodução cruzada e propagação vegetativa.

A distância genética entre os acessos de mandioca variou de 0,0 a 0,82, com média de 0,57. O dendrograma gerado (CCC=0,92\*\*) não evidenciou a formação clara de grupos de acordo com o tipo

de mandioca (macaxeira ou mandioca brava), o que geralmente é observado em trabalhos de divergência genética de mandioca (ELIAS et al. 2004, PERONI et al. 2007).

A partir da genotipagem com microssatélites, foram encontrados 34 pares de duplicatas, que apresentaram perfis multilocos idênticos e conseqüentemente, distância genética 0,0. A probabilidade de que dois indivíduos apresentem o mesmo perfil genético com os 15 locos utilizados e as freqüências alélicas obtidas foi de  $7,45 \times 10^{-13}$ . Ao se retirar os genótipos duplicados, a probabilidade de identidade aumentou um pouco para  $7,86 \times 10^{-13}$ .

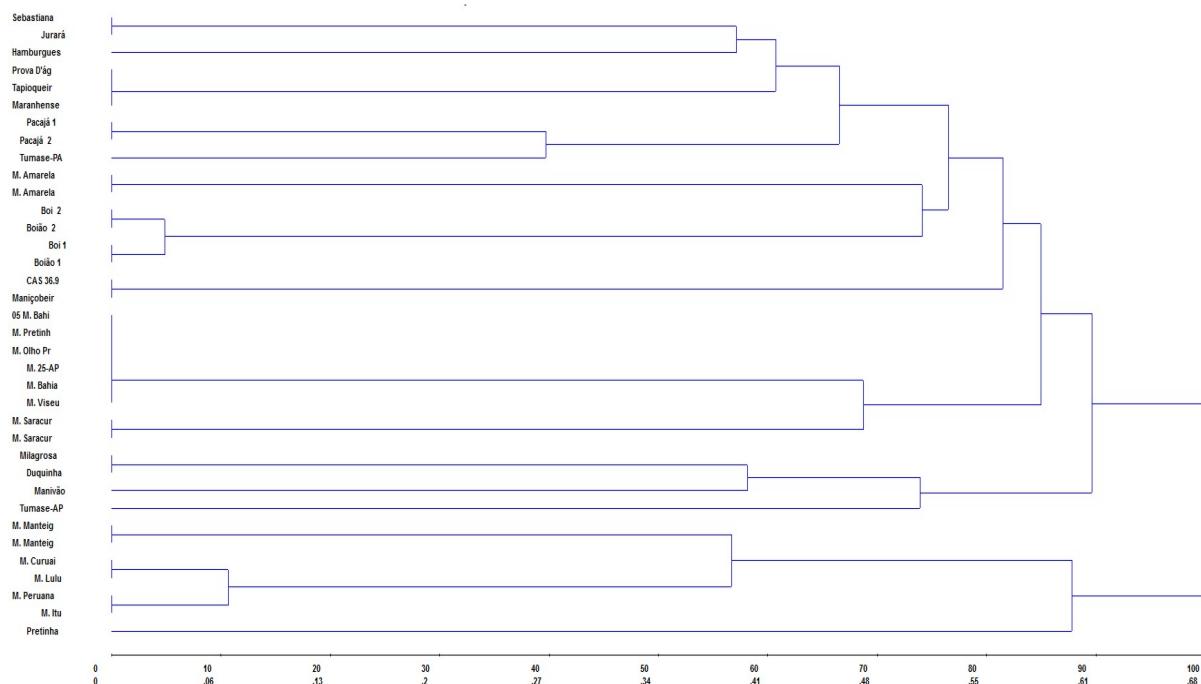
**Tabela 1.** Dados de local e ano de coleta dos acessos de mandioca coletados. A letra M. (de macaxeira) indica os acessos de mandioca doce.

| Grupo de<br>semelhança | Código no BAG | Nome comum          | Local de coleta                | Ano de<br>coleta |
|------------------------|---------------|---------------------|--------------------------------|------------------|
| 1                      | CPATU 162     | M. Saracura-BA      | Estado da Bahia                | 1995             |
|                        | CPATU 021     | M. Saracura         | Desconhecido                   | 1950             |
| 2                      | CPATU 019     | M. Manteiga –<br>PA | Ilha do Mosqueiro, PA          | 1950             |
|                        | CPATU 183     | M. Manteiga –<br>AP | Pedra Branca do Amapari,<br>AP | 1996             |
| 3                      | CPATU 023     | M. Olho Preto       | desconhecido                   | 1950             |
|                        | CPATU 147     | M. Viseu            | Viseu, PA                      | 1994             |
| 4                      | CPATU 122     | M. 25-AP            | Pedra Branca do Amapari,<br>AP | 1993             |
|                        | CPATU 177     | M. Bahia            | Ferreira Gomes, AP             | 1996             |
|                        | CPATU 376     | 05 M. Bahia         | Moju, PA                       | 2002             |
|                        | CPATU 448     | M. Pretinha         | Terra Alta, PA                 | 2009             |
|                        | CPATU 057     | M. Peruana          | Alenquer, PA                   | 1970             |
|                        | CPATU 009     | Hamburguesa         | desconhecido                   | 1947             |
|                        | CPATU 366     | M. Itu              | Belém, PA                      | 2002             |
|                        | CPATU 193     | Maranhense          | Bragança, PA                   | 1996             |
|                        | CPATU 397     | Prova D'água        | Acará, PA                      | 2005             |
|                        | CPATU 029     | Tapioqueira         | Belém, PA                      | 1960             |
| 6                      | CPATU 033     | Boi 1               | Santarém, PA                   | 1960             |
|                        | CPATU 317     | Boi 2               | Belterra, PA                   | 2001             |
|                        | CPATU 083     | Boião 1             | Santarém, PA                   | 1986             |
|                        | CPATU 305     | Boião 2             | Santarém, PA                   | 2001             |
| 7                      | CPATU 339     | M. Curuai           | Santarém, PA                   | 2001             |
|                        | CPATU 340     | M. Lulu             | Santarém, PA                   | 2001             |
| 8                      | CPATU 255     | CAS 36.9            | Santa Bárbara, PA              | 2000             |
|                        | CPATU 143     | Maniçobeira         | Belém, PA                      | 1994             |
| 9                      | CPATU 069     | M. Amarela          | Santana do Araguaia, PA        | 1970             |
|                        | CPATU 070     | M. Amarela 2        | Santana do Araguaia, PA        | 1970             |
| 10                     | CPATU 261     | Pretinha            | Paragominas, PA                | 2000             |
|                        | CPATU 459     | Manivão             | Bragança, PA                   | 2009             |
|                        | CPATU 285     | Pacajá 1            | Paragominas, PA                | 2000             |
|                        | CPATU 457     | Pacajá 2            | Bragança, PA                   | 2009             |
| 11                     | Ainda sem id  | Milagrosa           | Igarapé-Açu, PA                | 2009             |
|                        | CPATU 357     | Duquinha            | Castanhal, PA                  | 2001             |
| 12                     | CPATU 458     | Tumase-PA           | Bragança, PA                   | 2009             |
|                        | CPATU 124     | Tumase-AP           | Oiapoque, AP                   | 1993             |
| 13                     | CPATU 404     | Sebastiana          | Santa Maria do Pará, PA        | 2005             |
|                        | CPATU 013     | Jurará              | Belém, PA                      | 1947             |

A análise mostrou várias situações: confirmações de materiais com o mesmo nome que possuem o mesmo genótipo, materiais com o mesmo nome que são diferentes e materiais com nomes distintos que possuem o mesmo genótipo. Entre os materiais identificados como duplicatas, estão materiais que foram coletados em épocas bem distintas, como os genótipos Sebastiana e Jurará. O acesso Sebastiana foi coletado em 2005, enquanto o acesso Jurará foi coletado em 1947, ambos no Estado do Pará. Há outros exemplos no estudo, como as variedades Maranhense, Prova d' água e Tapioqueira e seis materiais de macaxeiras, materiais com distância igual a 0,0 entre cada par. Entre esses seis materiais de macaxeira, do grupo 3 (Tabela 1), dois foram coletados no Estado do Amapá, enquanto os demais foram coletados em diferentes locais do Pará. Isso confirma a natureza de troca de materiais entre diferentes agricultores, e que influencia a pouca estruturação geográfica dos genótipos de mandioca (ELIAS et al. 2004, SIQUEIRA et al. 2009).

Ao contrário, também houveram variedades que mantiveram suas denominações ao longo dos anos e em diferentes locais de coleta, como a Pacajá e as macaxeiras Manteiga e Saracura.

A identificação de duplicatas em bancos de germoplasma pode estar relacionada ao fato das trocas de propágulos entre agricultores de diferentes regiões ser comum, em especial quando a planta tem importância econômica. No novo local, aquele genótipo deve receber uma nova denominação, causando confusão nas coletas e armazenamento dos acessos nos bancos de germoplasma.



**Figura 1:** Dendrograma (CCC=0.92\*\*) gerado pelo método UPGMA e baseado nas distâncias genéticas entre 36 acessos de mandioca genotipados com 15 marcadores microssatélites.

### Conclusões

O estudo mostrou a ocorrência de duplicatas em um banco de germoplasma de mandioca constituído principalmente por etnovariedades coletadas na Região Norte do Brasil, e evidenciou a ocorrência de materiais específicos espalhados por diferentes localidades da região. A identificação

dessas duplicatas será de extrema utilidade no manejo do BAG, e também para a seleção de variedades para testes avançados no campo, já que se evitará análise de materiais idênticos.

### 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 American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**, v.52, p.242-25, 2004
- FUKUDA, W.M.G.; GUEVARA, C.L. **Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**, Cruz das Almas: Embrapa – CNPME, 1998, 38p.
- 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.
- PAETKAU, D.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. **Molecular Ecology**, v.3, p.489-495, 1994.
- 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.
- ROBICHAUD, R.; GLAUBITZ, J.C.; RHODES JR., O.E.; WOESTE, K. A robust set of black walnut microsatellites for parentage and clonal identification. **New Forests**, v.32, p.179-196, 2006.
- SIQUEIRA, M.V.B.M.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; BORGES, A.; PEREIRA, K.J.C.; PINTO, J.G.; VEASEY, E.A. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.104-110, 2009.
- VAN TREUREN, R.; KEMP, H.; ERNSTING, G.; JONGEJANS, B.; HOUTMAN, H.; VISSER, L. Microsatellite genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh) genetic resources in the Netherlands: application in collection management and variety identification. **Genetic Resources and Crop**

**Evolution**, v.57, p.853-865, 2010.