

IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Manihot sp.* COM ALELOS DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO AFRICANO

Thamyres Cardoso da Silveira¹; Livia de Jesus Vieira²; Carlos Alberto da Silva Ledo³; Cláudia Fortes Ferreira³; Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira¹ e Eder Jorge de Oliveira³

¹Estudante de graduação do curso de Ciências Biológicas da UFRB. Bolsista PIBIC/ CNPq da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. E-mail: tcssilveira@gmail.com

²Estudante de doutorado em Biotecnologia da UEFS, Feira de Santana, BA.

³Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Introdução

O vírus do mosaico africano da mandioca (Cassava mosaic disease – CMD) é a virose mais importante da cultura, sendo encontrada na África, Índia, Malásia e Ásia. As epidemias são devastadoras podendo comprometer mais de 95% da produção (Jennings, 1994; Thresh et al., 1994). O vírus é transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci* e disseminado pelo plantio de manivas infectadas.

O CMD é geralmente encontrado nas áreas de pequenos agricultores de mandioca que nem sempre podem seguir consistentemente práticas de saneamento, como o plantio de estacas livre da CMD e remoção de plantas doentes. Um dos métodos de controle da doença é o uso de materiais resistentes. A resistência foi encontrada no terceiro retrocruzamento derivado de um cruzamento interespecífico entre mandioca e *Manihot glaziovii*, sugerindo o uso de espécies silvestres de *Manihot* como uma alternativa para a busca de alelos que conferem resistência ao vírus do mosaico africano. A Análise genética clássica e o mapeamento genético-molecular das variedades locais mostraram que um gene dominante confere resistência, sendo encontrado em variedades locais de mandioca na Nigéria. O gene de resistência à CMD, denominado CMD2, está localizado no grupo R de ligação do mapa molecular de mandioca (Fregene et al., 1997; Akano et al., 2002). Essa descoberta permitiu que fossem desenvolvidos marcadores moleculares ligados à resistência à doença. Apesar da CMD não ter sido relatada no Brasil, o vetor da doença tem sido encontrado nas Américas e seu novo biótipo B (*B. argentifolia*) agora é generalizado (Fregene et al., 2007). Com isso, é necessário o desenvolvimento de trabalhos direcionados para a avaliação e seleção precoce de genótipos com possível resistência ao CMD no Brasil, onde o vírus ainda não se encontra presente.

A seleção assistida por de marcadores moleculares tem sido empregada em estudos que visam à identificação de alelos de interesse, como resistência a doenças. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi identificar acessos do gênero *Manihot* com alelos para resistência ao vírus do mosaico africano.

Material e Métodos

Foi utilizado o DNA de folhas jovens de 20 plantas, sendo 10 acessos de *Manihot esculenta* Crantz (BGM 1269, BGM 867, BGM 549, BGM 537, BGM 382, BGM 120, BGM 70, BGM 1064, BGM 19 e BGM 1316) e 10 acessos de espécies silvestres do gênero *Manihot* (*M. irwinii*, *M. dichotoma*, *M. anomala*, *M. caerulenses*, *M. peruviana*, *M. glaziovii*, *M. jacobinensis* e três genótipos de *Manihot spp.*) pertencentes ao banco de germoplasma de mandioca e a coleção de espécies silvestres de *Manihot* da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Para as análises moleculares foram testados quatro iniciadores ligados ao gene de resistência ao mosaico africano, sendo três do tipo SSR (NS158, SSRY 28, SSRY 040) e um do tipo SCAR (RME1).

Cada iniciador está associado a um tamanho específico de fragmento, a citar: SSRY28 – 180 pares de bases (pb), SSRY 040 – 231 pb, NS158 – 230 pb e RME1 – 700 pb. As reações de amplificação foram feitas em volume final de 15 µl contendo 10ng de DNA, 0,4 uM dos iniciadores e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), dNTP, tampão e MgCl₂ (Tabela 1).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, sendo corados com brometo de etídio (0,5 mg.mL⁻¹), e visualizados em transiluminador com luz UV (UVITEC, Modelo SXT 40 M) e fotografado em sistema fotodocumentação (Vilber Lourmat). Utilizou-se padrão de peso molecular de 50 e 100 pb para análise dos fragmentos.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para identificação de possíveis acessos resistentes ao mosaico africano e concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR. Temperatura de anelamento (Ta°C).

Iniciador	Ta°C	dNTP	Tampão	MgCl ₂
NS158	60	0,2mM	1X	1,5mM
SSRY 28	55	0,2mM	1X	1,5mM
SSRY 040	55	0,2mM	1X	2,5mM
RME1	52	0,2mM	1X	2,5mM

Resultados e Discussão

Dos 20 acessos avaliados, 50% apresentaram amplificação pelo menos uma banda com o tamanho específico dos fragmentos relacionados à resistência ao mosaico africano.

Os acessos de mandioca BGM 1269, BGM 549, BGM 537, BGM 382, BGM 120 e BGM 1316 e as espécies silvestres *M. peruviana*, *M. dichotoma* e *M. caerulenses* apresentaram fragmento semelhante com tamanho do alelo de que confere resistência ao CMD quando foi utilizado o iniciador SSRY 28. Apenas o genótipo da espécie *Manihot anomala* apresentou a marca associada ao CMD2 com o uso do iniciador SSRY 040 (Figura 1).

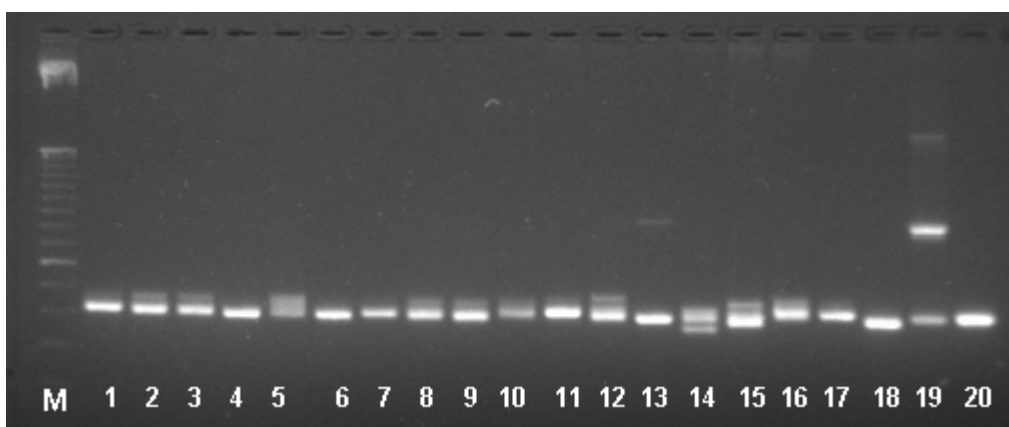


Figura 1. Resultado da amplificação com o iniciador SSRY 040 em gel de agarose 1000 3%. 1: BGM 1269; 2: BGM 867; 3: BGM 549; 4: BGM 537; 5: BGM 382; 6: BGM 120; 7: BGM 70; 8: BGM 1064; 9: BGM 19; 10: BGM 1316; 11: Irw A02707; 12: Dic 60204; 13: *M. spp* (ComDF 07); 14: Ano 074v02; 15: *M. spp.* (Man 065); 16: CaeBM 20; 17: Per 009v; 18: Gla 59012; 19: *M. spp* (FRF 1522); 20: Jac 04. M=marcador ladder de 50 pb (Invitrogen®). Seta indica alelo associado à resistência à CMD - iniciador SSRY 040.

Boateng (2010) em trabalhos de seleção assistida por marcadores avaliou-se os iniciadores (SSRY 28, NS 158 e RME 1) em progênies derivadas de retrocruzamento e observou que 82% dos genótipos apresentaram pelo menos uma marca associada ao gene CMD2, concluindo que os três marcadores associados com o gene de resistência foram capazes de selecionar as progênies resistentes.

Os iniciadores NS 158 e RME1 não resultaram em amplificação de bandas em nenhum dos acessos avaliados neste trabalho.

Não foi identificado nenhum genótipo que apresentasse os quatro tamanhos de fragmentos específicos relacionado aos iniciadores utilizados. Entretanto, os indivíduos que apresentaram pelo menos uma banda relacionada à resistência, poderão ser utilizados em trabalhos futuros envolvendo desenvolvimento de variedades e piramidização de alelos de resistência.

Conclusões

Apesar de não ter sido identificado genótipos com as marcas relacionadas aos quatro iniciadores, os acessos que apresentaram alguma das marcas sob seleção podem ser usados em trabalhos que visem à incorporação de alelos responsáveis por conferir resistência à CMD.

Referências

BOATENG, P.A. Using marker assisted selection technique as a tool to identify cassava mosaic disease resistant cultivars in first- backcross populations. 94f. Kwame Nkrumah University of Science and Technology. 2010.

AKANO, A., BARERA, E.; MBA, C.; DIXON, A.G.O.; FREGENE, M.A. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 521–525, 2002.

FREGENE, M.; ANGEL, F.; GOMEZ, R.; RODRÍGUEZ, F.; CHAVARIAGA, P.; ROCA, W.; TOHME, J.; BONIERBALE, M. A molecular genetic map of cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 431–441, 1997.

FREGENE, M.A.; OKOGBENIN, E.,; PORTO, M.C.M.; EGESI ,C.; MBA, C. ESPINOSA, E.; SANTOS, L.G.; OSPINA, C.; MARÍN, J.; BARRERA, E.; GUTIÉRREZ, J.; EKANAYAKE, I.; IGLESIAS, C. Marker-Assisted Introgression of Resistance to Cassava Mosaic Disease into Latin American Germplasm for the Genetic Improvement of Cassava in Africa. **Crop Science**, v. 47, p. 1895-1904, 2007.

JENNINGS, D. L. Breeding for resistance to African cassava mosaic geminivirus in East Africa. **Trop Sci.**, v. 34, p. 110–122, 1994.

THRESH, J.M; FARGETTE, D, OTIM-NAPE, G.W. Effects of African cassava mosaic geminivirus on the yield of cassava. **Trop Sci**, v. 34, p. 26–42, 1994.

