



POLIMORFISMO DA TÉCNICA *TARGET REGION AMPLIFICATION* *POLYMORPHISM (TRAP)* PARA ESTUDOS MOLECULARES EM MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

Catia Dias do Carmo¹, Dalma Brito Santos², Vandeson Rodrigues de Sousa² e Eder Jorge de Oliveira³

¹ Estudante de Recursos Genéticos Vegetais da *Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura*, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: inrict@yahoo.com.br

² Estudante de Biologia da *Universidade Federal do Recôncavo da Bahia*, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: dalma.brito@yahoo.com.br; vandemons@yahoo.com.br

³ Pesquisador da *Embrapa Mandioca e Fruticultura*, Caixa Postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: eder.oliveira@embrapa.br

Introdução

O uso de marcadores moleculares constitui-se em uma técnica rápida que elimina a interferência dos fatores ambientais inerentes aos marcadores morfo-agronômicos na caracterização da diversidade e na busca por genes de interesse em diversas espécies. A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apesar de diversos trabalhos de caracterização molecular, ainda necessita de maiores informações sobre sua expressão gênica e marcadores associados.

O marcador TRAP é uma técnica baseada em PCR, que utiliza informações de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) para gerar marcadores polimórficos relacionados a genes candidatos (HU e VICK, 2003). Alguns marcadores moleculares foram desenvolvidos para mandioca a partir de ESTs, a exemplo de microssatélites (ZOU et al, 2011). No entanto, a técnica TRAP traz como vantagem, além da amplificação de genes candidatos, a capacidade de produzir perfil de amplificação com muitas bandas por gel, o que diminui o custo por informação de polimorfismo. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de detecção de polimorfismo em regiões gênicas na cultura da mandioca com uso de marcadores do tipo TRAP.

Material e Métodos

Foram desenhados 99 iniciadores a partir de sequências EST (*Expressed Sequence Tags*) relacionadas à *M. esculenta* obtidas no banco de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) com auxílio do programa Primer3 versão 0.4.0 (ROZEN E SKALETSKY, 2000), onde apenas o iniciador *forward* foi utilizado. Como reverso, foram desenhados quatro iniciadores arbitrários conforme Hu e Vick (2003).

Com intuito de analisar o padrão de amplificação destes iniciadores, testes iniciais de otimização da PCR foram realizados por Oliveira et al. (2011). Das 396 combinações de iniciadores TRAP avaliadas, foram selecionadas combinações de iniciadores fixos e arbitrários com maior nível de polimorfismo para as análises moleculares em 46 acessos de germoplasma do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

A extração do DNA genômico, as condições de amplificação e eletroforese foram realizadas conforme Oliveira et al (2011). Os produtos amplificados foram registrados em código binário (“1” presença; “0” ausência). Marcas monomórficas, pouco legíveis e/ou amplificados com mais de 10% de dados perdidos

foram retiradas da análise. Foram analisados: a porcentagem de polimorfismo; o poder de resolução do marcador (PREVOST e WILKINSON, 1999); diversidade genética de Nei (heterozigosidade esperada – He); Conteúdo de Informação Polimórfica – PIC, com auxílio do programa GenAEx (6.4) (PEAKALL e SMOUSE, 2006).

Resultados e Discussão

Das combinações selecionadas por Oliveira et al (2011), 69 foram incluídas nas análises (Tabela 1). No total, 13.318 bandas nítidas foram obtidas, das quais 85% foram polimórficas. Dentre as combinações analisadas, merecem destaque a combinação Trap89+Arb3 com 399 bandas amplificadas todas polimórficas e a combinação Trap98+Arb3 que apresentou a maior quantidade de bandas (417), porém com apenas 45% de polimorfismo.

Por iniciador, em média, foram encontradas 164 bandas polimórficas. Das combinações analisadas, 40 combinações apresentaram 100% de polimorfismo, correspondendo a 58% do total. Níveis semelhantes de polimorfismo foram encontrados em *Vicia faba* L. (KWON et al. 2010) utilizando a mesma técnica. Por outro lado, ao utilizarem marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) em mandioca, Mühlen et al. (2000) e Vieira et al. (2010) encontraram em média níveis de polimorfismo inferiores (55,8% e 62% respectivamente) aos encontrados neste trabalho (83,4%). Da mesma forma, utilizando marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) Mühlen et al. (2000), encontraram abaixo de 70% de marcadores polimórficos. Portanto, essa técnica se mostra mais eficiente para encontrar polimorfismos em mandioca em comparação a outros marcadores dominantes.

O número de alelos que efetivamente contribuíram para a diversidade genética foi em média 1,47. A probabilidade de indivíduos heterozigotos variou de 0,5 a 0,1 (Tabela 1).

Em relação ao PIC, quanto mais próximo de um, maior o poder discriminatório na detecção de polimorfismo do marcador. No entanto, valores de PIC para marcadores dominantes são menores, devido ao seu caráter bialélico (ausência ou presença da banda). Os valores médios encontrados no presente trabalho (0,23), são similares aos por Vieira et al. (2010) em mandioca. Maiores valores de PIC foram encontrados na combinação Trap24+Arb2 (0,38) e, portanto uma combinação mais informativa.

O parâmetro Rp indica a informatividade do marcador (PREVOST e WILKINSON, 1999). Maiores valores de Rp foram encontrados nas combinações Trap81+Arb3 e Trap27+Arb3 (6,3). A combinação Trap91+Arb1 se mostrou a menos informativa com Rp de 0,3 e menor PIC de 0,1 sendo, portanto não recomendada para futuras análises em mandioca.

Marcadores polimorfismos gene-alvo encontrados neste trabalho podem ser utilizados ainda na identificação de QTIs (*Quantitative Trait Loci*) para mapeamento genético, *fingerprinting* de variedades e na estimativa da diversidade genética em mandioca. Além disso, a possibilidade de desenho de iniciadores TRAP em diversas rotas metabólicas potencializa sua utilização como marcadores funcionais (associados a um fenótipo de interesse agrônômico) utilizados na seleção assistida.

Tabela 1. Relação das combinações de TRAP utilizados e respectivas análises.

TRAP	Arb	Forward (5'–3')	N.º de bandas		%Poli	Ne	He	PIC	Rp
			Total	Poli					
Trap6	1 - GACTGCGTACGAATTAAT	CTGATCAGAGCAAAGCAA	168	168	100,0	1,4	0,3	0,2	4,0
Trap10		GTAAGGGGCAATAGATG	105	59	56,2	1,4	0,2	0,2	2,0
Trap20		TGGCTACTGCTGAGGTAA	196	196	100,0	1,4	0,3	0,2	5,5
Trap32		ATCTTGAGTGTCCTTGTG	212	167	78,8	1,5	0,3	0,2	5,3
Trap34		CAGGACTTGGAGGATTTC	265	219	82,6	1,4	0,2	0,2	3,5
Trap60		GCTCCTTTCATTGACCTTA	56	10	17,9	1,3	0,2	0,2	4,9
Trap66		TTTTGAAGCTGGTATTTCC	141	141	100,0	1,4	0,3	0,2	4,3
Trap68		ACACCCAGACCCTCTTC	134	134	100,0	1,4	0,3	0,2	4,5
Trap84		ATGAACGGTCTTCCAATC	116	116	100,0	1,4	0,2	0,2	1,5
Trap85		GGGAAGATTGACAAATTCA	158	26	16,5	1,7	0,4	0,3	3,0
Trap86		AGGAGGAGAAGCAGAAGAT	264	172	65,2	1,5	0,3	0,2	1,4
Trap88		CCTGAATGGCTTGTTTTAT	107	66	61,7	1,8	0,4	0,3	3,5
Trap91		ATCATCCAAAACAGAGGA	155	109	70,3	1,1	0,1	0,1	0,3
Trap92		ATTTTTCTGATGCCCACT	180	180	100,0	1,5	0,3	0,3	1,8
Trap97		TGATATTGCCTGATGATGA	327	327	100,0	1,5	0,3	0,3	2,2
Trap2	2 - GACTGCGTACGAATTGCG	CCAAACTGACATGATTGC	91	91	100,0	1,6	0,3	0,3	3,8
Trap7		AGAGAAGGTCCGTTTGAG	157	157	100,0	1,5	0,3	0,3	4,3
Trap8		TGCCCTTTTCTTCAGATAG	275	275	100,0	1,4	0,2	0,2	3,1
Trap9		CTGGTCTGGAGAAGCAGT	113	113	100,0	1,3	0,2	0,2	2,6
Trap13		GGCTTTATCACTGGGAAG	310	218	70,3	1,6	0,3	0,3	4,0
Trap16		GATGGGATACCTTTGGAA	183	183	100,0	1,1	0,1	0,1	0,9
Trap24		GGCTTTCATTTCTCACATC	81	81	100,0	2,0	0,5	0,4	0,5
Trap35		GTCTTCCATTGGCTCTTC	178	178	100,0	1,5	0,3	0,3	4,2
Trap36		AAATGTCGTGGAGTTCCT	168	122	72,6	1,6	0,3	0,3	2,5
Trap39		TGACGACTGGAAAGAGATT	160	160	100,0	1,5	0,3	0,2	3,7
Trap46		GCTTCAATTGGGAAACTC	336	290	86,3	1,4	0,3	0,2	2,2
Trap57		TGTTTTACATCCACAACCA	118	118	100,0	1,4	0,3	0,2	1,7
Trap58		AGGTCTGTCTGAGGCTTCT	183	183	100,0	1,1	0,1	0,1	0,4
Trap59		GAAGGAATCAACAAGATCG	171	127	74,3	1,6	0,4	0,3	4,0
Trap69		AATGTTATCACGGCTGATT	102	63	61,8	1,6	0,3	0,3	4,2
Trap70	GATCATGGGTTGATGATTT	208	122	58,7	1,5	0,3	0,3	1,8	
Trap77	AAGGTGGTATGCCTGAAT	186	186	100,0	1,2	0,1	0,1	1,2	

Tabela 1. Cont...

Fixo	Arb	Forward (5' – 3')	N.º de bandas		% Poli	Ne	He	PIC	Rp
Trap5		CCATATGGGAAATGAACC	117	117	100,0	1,7	0,4	0,3	3,9
Trap11		TGGTCTTATGGGTGGTT	70	70	100,0	1,5	0,3	0,3	4,1
Trap17		AATGGGAACTCACCACAT	112	20	17,9	1,4	0,3	0,2	3,5
Trap18		AACCTAACAAGATACCCCAAG	264	264	100,0	1,6	0,3	0,3	4,8
Trap19		AGGTATCCCAAGAAATCG	214	214	100,0	1,4	0,3	0,2	2,6
Trap20		TGGCTACTGCTGAGGTAA	195	151	77,4	1,5	0,3	0,3	5,3
Trap21		GGCAGAGAAAGGAGTGAC	375	375	100,0	1,3	0,2	0,2	1,6
Trap26		GAGGGAAAGAAATTGTGC	123	33	26,8	1,6	0,3	0,3	5,4
Trap27		GTTCCTTGAGAGGTGGAG	188	188	100,0	1,6	0,4	0,3	3,2
Trap28		GGGGAAGACAACAATGAT	197	197	100,0	1,5	0,3	0,2	6,3
Trap40		CCCGTTGTATGCTCACTAT	190	190	100,0	1,5	0,3	0,3	3,3
Trap42		ACATTCCATCACCTTGTC	125	125	100,0	1,4	0,3	0,2	2,6
Trap45		GGTGGAAAAGGTGAGAATA	77	31	40,3	1,5	0,3	0,2	4,7
Trap47		GTGAAGAAAGGGAGATGG	163	163	100,0	1,5	0,3	0,3	5,1
Trap48		CAAATCCCAAGATTCCTC	134	134	100,0	1,5	0,3	0,2	4,9
Trap52		ATTTGGACCGATCAAGAC	254	254	100,0	1,4	0,2	0,2	2,7
Trap61		TATCAGGTGCACACACACT	153	153	100,0	1,4	0,2	0,2	4,3
Trap71		AGCATCCCACTACAAGGTA	349	257	73,6	1,4	0,2	0,2	0,8
Trap75		TAACTCCATCCATGACCA	374	328	87,7	1,6	0,4	0,3	1,2
Trap76		TCAGGTGAAACGTCTGAA	214	171	79,9	1,5	0,3	0,3	1,5
Trap81		GATTCGAAGTGAGGTGTTT	261	261	100,0	1,5	0,3	0,2	6,3
Trap89		ACAATCCATGTCTTCGACT	399	399	100,0	1,5	0,3	0,3	5,1
Trap93		CCCAAATATTGGAGCTTA	170	170	100,0	1,7	0,4	0,3	3,8
Trap95		TTGGATAGGCTTTTTCAAC	160	160	100,0	1,7	0,4	0,3	3,7
Trap98		TTTTGGGATTTTACGAGAG	417	187	44,8	1,5	0,3	0,2	3,0
Trap22		TCAGATAATGCAGGATGC	265	133	50,2	1,4	0,2	0,2	2,0
Trap29		GCTTCTTCCACTCCTACAA	246	246	100,0	1,4	0,3	0,2	4,9
Trap31		TGGAAGGACGACTAAGGTA	184	138	75,0	1,4	0,3	0,2	3,5
Trap33		AAATCTCCACTCCACCAC	161	161	100,0	1,5	0,3	0,2	4,2
Trap38		GGAGAGGAGATCACTCCA	180	136	75,6	1,3	0,2	0,2	5,8
Trap41		TCTGGTAGAAGCCTTTCAG	292	208	71,2	1,4	0,3	0,2	2,5
Trap43		CAGAGAAGGTCCATTTGAG	152	152	100,0	1,5	0,3	0,2	1,0
Trap79		GAGACAAACAAGCAAGCA	278	241	86,7	1,6	0,4	0,3	2,3
Trap82		GGGAGGGACTAGTGAAGAC	243	243	100,0	1,6	0,3	0,3	1,4
Trap90		CTATGTTTGGGGTTTGGT	209	119	56,9	1,5	0,3	0,3	3,3
Trap99		TTGGTTTAATTGCTGTTGA	54	8	14,8	1,6	0,3	0,3	4,2
			Média		83,4	1,5	0,3	0,2	3,2

Arb=Iniciador arbitrário (reverso); Poli = polimorfismo; % Poli = Porcentagem de polimorfismo; He = Heterozigose Esperada; PIC = Conteúdo de Informação Polimórfica; Rp = Poder de resolução do marcador.

Conclusões

O grande número de fragmentos amplificados por iniciador TRAP possibilitou o acesso a um maior volume de informação em uma mesma reação de PCR. Portanto, TRAP é uma técnica bastante prática e informativa na geração de marcas associadas a características de interesse em mandioca.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao convênio CAPES/Embrapa e a FAPESB pelo apoio financeiro e concessão das bolsas de estudo.

Referências

HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.2 p. 289-294, 2003.

KWON, S.J.; HU, J.; COYNE, C. J. Genetic diversity and relationship among Faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm entries as revealed by TRAP markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v.8, p. 204-213, 2010.

MÜHLEN, G.S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, v.57, p.319-328, 2000.

OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J.; SANTOS, V. S. Desenvolvimento da técnica da Trap (*Target Region Amplification Polymorphism*) para análises genéticas em mandioca. **Anais... In: XIV Congresso Brasileiro de Mandioca**, Maceió – AL, 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v.28, p. 2537-2539, 2012.

PREVOST A.; WILKINSON M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.107–112, 1999.

ROZEN, S.; H.J. SKALETSKY. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. p. 365–386. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (ed.) **Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology**. P Humana Press, Totowa, NJ. 2000.

VIEIRA, A.L.; FREITAS FIALHO, J.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K.G.; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, M. S. Caracterização molecular e variabilidade genética de acessos elite de mandioca para fins industriais. **Ciência Rural**, v.40, p.2467-2471, 2010

ZOU, M.XIA, Z.; LING, P.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; WEI, Z.; BO, W.; WANG, W. Mining EST-Derived SSR markers to assess genetic diversity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Molecular Biology** v.29, p. 961–971, 2011.