



14^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POSSÍVEIS DUPLICATAS NO BANCO DE GERMOPLASMA DE MANDIOCA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Girena Fernandes Ramalho¹, Elisa Ferreira Moura², João Tomé de Farias Neto³, Diehgo Tuloza da Silva⁴

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

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

³Pesquisador A, Dr. em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Amazônia Oriental, e-mail: tome@cpatu.embrapa.br

⁴Estudante de Ciências Biológicas, UFPA, Bolsista PIBIC Fapespa, e-mail: dbiotuloza@hotmail.com

Resumo: A caracterização morfo-agronômica de acessos de mandioca pertencentes ao BAG da Embrapa Amazônia Oriental identificou materiais fenotipicamente semelhantes, apesar de coletados em locais diferentes. Dessa forma, realizou-se a genotipagem por meio de marcadores microssatélites para confirmar se os materiais eram realmente duplicatas. Apesar de a análise ter sido realizada em gel de agarose, foi possível identificar pares de acessos que não correspondiam a duplicatas, mesmo possuindo caracteres morfo-agronômicos em comum. Isso indica que a genotipagem por marcadores microssatélites deve ser usada como complemento na caracterização de acessos e identificação de duplicatas no BAG de mandioca. Além disso, as dissimilaridades genéticas variaram de 0 a 1, indicando uma que o BAG de mandioca contém uma ampla variabilidade genética.

Palavras-chave: caracterização molecular, SSR, *Manihot esculenta*

Introdução

O Banco de Germoplasma de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) 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 se selecionam materiais para testes mais avançados. A base do BAG da Instituição é composta por materiais coletados em propriedades de agricultores familiares, principalmente no Pará. Atualmente o BAG conta com 465 acessos, que são avaliados quanto a 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.



14^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

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 e podem gerar um *fingerprint* do acesso. 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 40 acessos do Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Oriental, dos quais 43 pares de acessos apresentavam semelhança morfo-agronômica (Tabela 1).

Tabela 1 Grupos de acessos do BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental que são considerados semelhantes morfo-agronomicamente.

1 (CPATU 162) e 02 (CPATU 021)	11 (CPATU 146), 12 (CPATU 108)	18 (CPATU 193), 19 (CPATU 397) e 20 (CPATU 029)	27 (CPATU 255) e 28 (CPATU 143)	35 (sem id) e 36 (CPATU 357)
03 (CPATU 019) e 04 (CPATU 183)	13 (CPATU 160) e 14 (CPATU 160)	21 (CPATU 33), 22 (CPATU 317), 23 (CPATU 83) e 24 (CPATU 305)	29 (CPATU 269) e 30 (CPATU 176)	37 (CPATU 458) e 38 (CPATU 124)
05 (CPATU 023), 06 (CPATU 147), 07 (CPATU 122), 08 (CPATU 177), 09 (CPATU 376) e 10 (CPATU 448)	15 (CPATU 57), 16 (CPATU 09) e 17 (CPATU 366)	25 (CPATU 339) e 26 (CPATU 340)	31 (CPATU 261), 32 (CPATU 459), 33 (CPATU 285) e 34 (CPATU 457)	39 (CPATU 404) e 40 (CPATU 13)

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 09 *primers* de microssatélites de mandioca (SSRY82, SSRY21, SSRY09, SSRY59, SSRY110, SSRY106, SSRY12, SSRY101 e SSRY102) desenvolvidos por MBA et al. (2001). As reações de PCR foram preparadas para volume final de 20 µl, contendo 30 ng de DNA genômico, 1mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,1 µM de cada par de *primer* (*forward* e *reverse*), 10 mg.ml⁻¹ de BSA (bovine serum albumin), 0,6 unidades da enzima Taq polimerase e tampão de reação contendo MgCl₂



14^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

fornecido pelo fabricante da enzima. Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo e corridos em eletroforese horizontal a 80v por 1 hora e 40 minutos. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta e as imagens foram armazenadas digitalmente. 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 para marcadores co-dominantes/multialélicos para obtenção das similaridades. O complemento $d = 1 - c$, correspondente a dissimilaridade genética, foi obtido para gerar o dendrograma pelo método UPGMA.

Resultados e Discussão

Dos nove *primers* avaliados, sete apresentaram polimorfismo (SSRY 82, SSRY 21, SSRY 09, SSRY 59, SSRY 106, SSRY 12 e SSRY 101) e os outros dois foram monomórficos (SSRY 110 e SSRY 102) na corrida em agarose a 3%. Os sete marcadores polimórficos amplificaram um total de 36 alelos, resultando em uma média de 5,14 alelos por loco. Constatou-se uma variação de 3 (SSRY 106) a 7 (SSRY 82, SSRY 09 e SSRY 59) alelos por *primer*.

Apesar de a análise ter sido realizada em gel de agarose, foi possível identificar acessos que não correspondem a duplicatas. Dos 43 pares de acessos identificados como possíveis duplicatas (dados não mostrados), pode-se afirmar que os pares de acessos 3 e 4; 11 e 12; 15 e 16; 15 e 17; 16 e 17; 29 e 30; 31 e 32; 31 e 33; 31 e 34; 32 e 33; 32 e 34; e 37 e 38 (12 pares) não são duplicatas. Assim, mostra-se que acessos morfo-agronomicamente semelhantes possuem diferenciação genética. A dissimilaridade genética entre os materiais 37 e 38, por exemplo, que correspondem aos acessos CPATU 458 e 124 e possuem mesma sinonímia (Tumase), foi 0,45. O coeficiente de dissimilaridade usado para calcular a distância genética entre as 40 variedades de mandioca variou entre de 0 a 1, mostrando grande variabilidade genética em uma pequena amostra do BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental. O dendrograma (Figura 1) mostra que acessos foram considerados idênticos (dissimilaridade igual a 0). Como a análise foi feita em corrida em gel de agarose, não é possível confirmar se esses acessos são realmente duplicatas.

Houve acessos que não compartilharam alelos em nenhum dos *primers* avaliados. Os acessos 25 e 26, que foram considerados idênticos foram totalmente divergentes dos acessos 21 a 24, também considerados idênticos (Figura 1). Os acessos 21 a 24 também foram totalmente divergentes ao acesso 32, e o acesso 11 não compartilhou alelos com os acessos 1, 2 e 30. Isso mostra a grande variação



14^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

genética dos materiais avaliados.

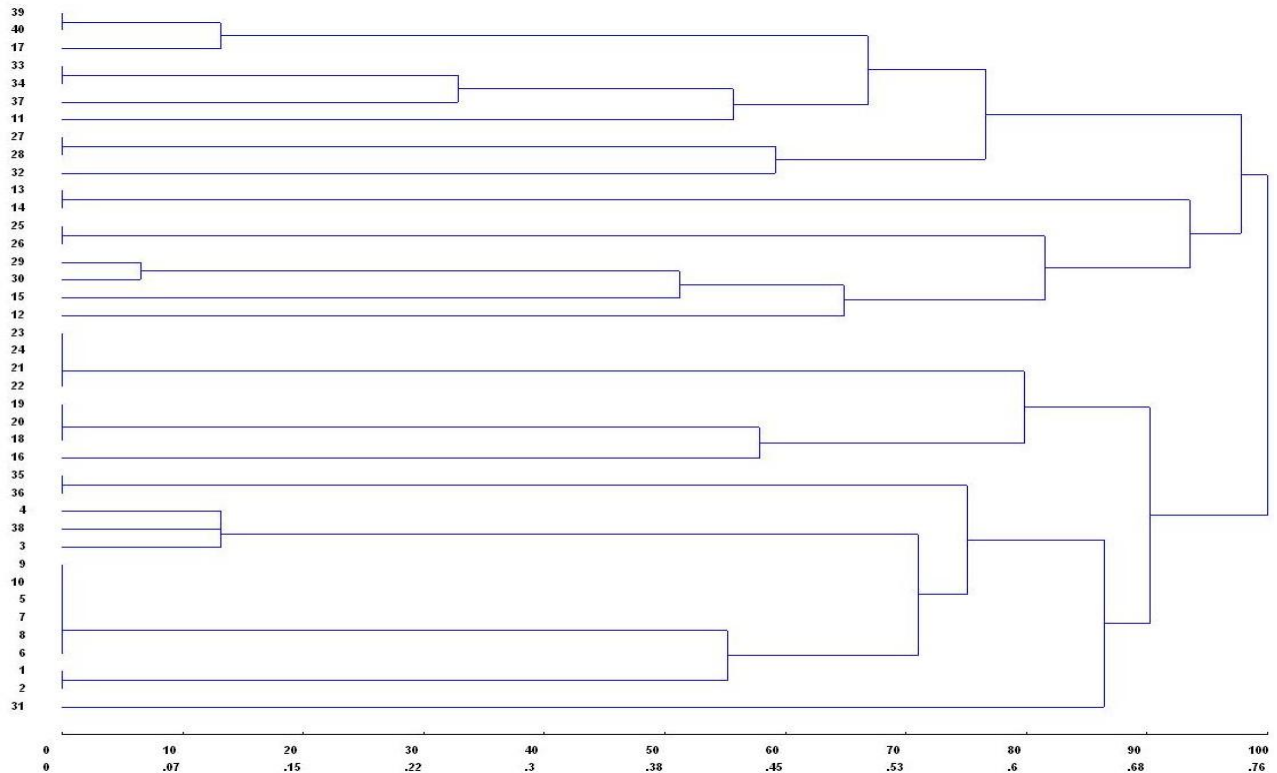


Figura 2 Dendrograma obtido pelo método UPGMA com as dissimilaridades genéticas entre 40 acessos de mandioca genotipados com marcadores microssatélites para verificar possíveis duplicatas.

Conclusões

Pela análise com marcadores microssatélites em pares de acessos de mandioca considerados semelhantes, pode-se dizer que a avaliação morfo-agronômica não é suficiente para determinar duplicatas, já que foi possível diferenciar acessos considerados semelhantes pela análise molecular.

Referências Bibliográficas

- CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.
- FUKUDA, W.M.G.; GUEVARA, C.L. **Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Cruz das Almas: CNPMF, 1998. 38p.
- MBA, R.E.C et al. 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.