



MARCUS VANNER CARVALHO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CLONES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*
Crantz) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS**

**LAVRAS - MG
2010**

MARCUS VANNER CARVALHO DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CLONES DE MANDIOCA
(Manihot esculenta Crantz) **DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Samuel Pereira de Carvalho

LAVRAS - MG

2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Oliveira, Marcus Vanner Carvalho de.

Caracterização molecular de clones de mandioca (*Manihot
esculenta* Crantz) da Universidade Federal de Lavras / Marcus
Vanner Carvalho de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2008.

82 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Samuel Pereira de Carvalho.

Bibliografia.

1. Biologia molecular. 2. Genética molecular. 3. Similaridade
genética. 4. Variabilidade genética. 5. Marcadores microssatélites. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.68223

MARCUS VANNER CARVALHO DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CLONES DE MANDIOCA
(Manihot esculenta Crantz) **DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de dezembro de 2008.

Dr. Juliano Gomes Pádua	EMBRAPA
Dr. Lisandro Thomas da Silva Bonome	UFLA
Dr. Telde Natel Custodio	UFLA
Dr. Moacir Pasqual	UFLA

Dr. Samuel Pereira de Carvalho
Orientador

LAVRAS – MG

2008

A Deus, pelas bênçãos passadas e futuras;

Aos Meus pais, pelo apoio carinho...

OFEREÇO

A Deus;
Aos Meus Pais;
A Minha Namorada

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A meus pais, Luiz Edson Mota de Oliveira e Mirlene Carvalho de Oliveira, ao Raimundo e a minha namorada Izaura Lucia Reis Mendonça,

Aos membros da minha banca, professores Juliano Gomes Pádua, Lisandro Thomas da Silva Bonome, Telde Natel Custódio, Moacir Pasqual e a todos que de uma forma direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, muito obrigado.

Deixo também um especial agradecimento ao Professor Samuel Pereira de Carvalho, pela dedicação, carinho e paciência demonstrados para com a minha pessoa.

RESUMO

A cultura da mandioca é fundamental para a alimentação de mais de 500 milhões de pessoas nos países situados entre os paralelos 30 °N e 30 °S, onde ela adapta-se bem devido à grande diversidade genética que apresenta. Como técnicas eficientes na identificação dessa variabilidade, os marcadores de DNA são úteis em estudos de evolução, domesticação, ecologia, filogenia, mapeamento genético e clonagem de genes. Objetivou-se identificar a variabilidade genética de 100 clones de mandioca da coleção de acesso UFLA, e também a semelhança molecular entre dez clones novos, obtidos por policruzamento entre cultivares de mesa e indústria já consagradas no mercado. A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA). Os clones de mandioca da coleção de acessos da UFLA foram caracterizados molecularmente utilizando-se marcadores microssatélites. Na primeira etapa, 100 clones foram identificados molecularmente, sendo 77 novos clones obtidos por policruzamento em 1998 na UFLA e 23 clones de cultivares já usadas popularmente. Na segunda etapa, avaliou-se o comportamento molecular em 10 clones de mandioca do acesso UFLA em relação a 10 cultivares comerciais, dentre elas cinco de mesa e cinco de indústria. Observou-se que os primers 7 e 11 não amplificaram alelos para nenhum dos 100 clones. O primer 13 foi o que apresentou maior polimorfismo. Os coeficientes de similaridade entre clones, nesta etapa, variaram de 0 a 94%. Houve formação de grupos homogêneos quando a similaridade média dentro dos grupos foi até 0,55. Na segunda etapa, os coeficientes de similaridade variaram de 15 a 75%. As cultivares “Fibra”, “IAC13” e “IAC15”, de propósito industrial, agruparam-se sob elevado índice de similaridade. O clone “UFLA E” agrupou-se com a cultivar “IAC 576/70”, assim como o clone “UFLA 7” agrupou-se com a cultivar “Casca-Roxa”. Portanto, os microssatélites mostraram-se eficientes para determinar a similaridade genética entre clones de mandioca da coleção de acesso da UFLA, e ainda possibilitaram identificar a aptidão comercial de clones novos de mandioca. Os dendrogramas gerados com base nos alelos amplificados demonstram a existência de grupos de clones geneticamente similares. Inferências são feitas com base nas identificações.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*. Marcadores. Microssatélites. Similaridade genética.

ABSTRACT

The characteristics of the clones used in the cassava cultivation vary in according to the commercial aptitude of the culture, for industrial processing or “in nature” human consumption. The present research aimed to identify new cassava clones obtained by polycross in the Federal University of Lavras (UFLA) in 1998 regarding those aptitudes. For such, an attempt was made to identify clones with molecular patterns similar to the patterns presented by the commercial clones. The methodology used for the DNA extraction and the obtaining the band patterns was the same recommended for the of Microsatellite molecular marker technique. The molecular characterization of the cassava clones of the UFLA accession and commercial clones already established presented a distribution similarity concentrated in two large groups. One group is composed by commercial “in nature” human consumption clones Baiana, Casca-roxa and IAC 576-70, and the UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 and UFLA 55 accesses. The other group is composed by commercial industrial processing clones, FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e IAC 15, and the UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 and UFLA 64 accesses. The commercial cultivar Ouro-do-vale and the clones UFLA 38 and UFLA 69 not framed in any group, either “in nature” human consumption or industrial processing, while the clone Pão-da-China (“in nature” human consumption) was grouped together with clones for the industrial processing. So, the use of primers was appropriate to group the clones for the “in nature” human consumption, but not for industry. Molecular markers of the type Microsatellites, using 13 primers for amplification, became possible to characterize 100 cassava clones, namely, 77 obtained by polycrossing in the year of 1998 in the Federal University of Lavras and 23 cultivars already in use by farmers. The obtaining of the genetic material from DNA extraction was done from leaves of cassava clones of the UFLA collection of accessions. The results point out that primer 13 presented higher amplification of alleles. However, primers 7 and 11 did not amplify alleles for none of the clones and bands. The dendrograms generated on the basis on the amplified alleles demonstrated the existence of groups of genetically similar clones and some inferences are done on the basis of the identification.

Keyword: *Manihot esculenta*. Microsatellite markers. Genetic similarity.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

Tabela 1	Clones obtidos na UFLA e cultivares comerciais utilizadas na determinação de similaridade genética em Lavras.....	52
Tabela 2	Seqüências dos primers (forward/reverse) usados em análises SSR.....	55
Tabela 3	Análise discriminante de clones de mandioca para mesa e indústria, baseada em k vizinhos mais próximos (k=3). Os valores destacados em negrito referem-se aos percentuais de alocação dos clones nos seus respectivos grupos de origem....	61

CAPITULO 3

Tabela 1	Clones obtidos na UFLA e cultivares comerciais utilizadas na determinação de similaridade genética em Lavras, MG, 2009. Clones obtained at the UFLA and commercial cultivars utilized in determining genetic similarity in Lavras, MG, 2009.....	71
----------	--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1

Gráfico 1	Principais países produtores de mandioca em 2000.....	20
-----------	---	----

CAPITULO 2

Figura 1	Dendrograma dos acessos de mandioca estudados, com base no índice de similaridade de Jaccard.....	59
----------	---	----

CAPITULO 3

Figura 1	Dendrograma da similaridade genética entre os 100 clones de mandioca baseados em marcadores Microsatélites (SSRs). Dendogram of genetic similarity among the 100 cassava clones based upon Micro satellite markers (SSRs).	77
----------	--	----

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	12
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A Mandioca.....	15
2.1.1	Citogenética da mandioca	18
2.1.2	Importância, consumo e produção	19
2.1.3	Diversidade genética entre espécies.....	21
2.1.4	Bancos de germoplasma	24
2.1.5	Caracterização dos acessos	25
2.1.6	Marcadores moleculares	26
2.1.6.1	Marcadores de Microsatélites	32
	REFERÊNCIAS.....	37
	CAPITULO 2 CARACTERIZAÇÃO DE CLONES DE MANDIOCA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES	47
1	INTRODUÇÃO.....	50
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Marcadores SSRs.....	54
3	ANÁLISE DOS DADOS	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	CAPITULO 3 VARIABILIDADE GENÉTICA DE CLONES DE MANDIOCA, ACESSADA POR MARCADORES DE MICROSSATÉLITES	67
1	INTRODUÇÃO.....	70
2	MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1	Marcadores SSRs.....	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.1	Marcadores SSR gel de poliacrilamida.....	77
3.2	Similaridade genética entre os clones.....	77
4	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A mandioca, espécie originalmente sul-americana, apresenta elevada diversidade genética em decorrência da facilidade de polinização cruzada, alta heterozigose e deiscência abrupta dos seus frutos, originando continuamente uma infinidade de novos genótipos. Essa diversidade é representada em sua maioria por variedades selecionadas naturalmente ou por agricultores (FUKUDA; COSTA; SILVA, 2005). Graças à diversidade genética, a mandioca é amplamente cultivada no Brasil e no mundo para os mais diferentes fins (CARVALHO; SCHALL, 2001; FERREIRA et al., 2008). Sua importância estende da alimentação básica, fundamental para mais de 500 milhões de pessoas no mundo, a uma série de produtos industriais (TAKAHASHI; GONÇALO, 2005).

Popularmente, suas variedades são classificadas em dois grupos: bravas ou amargas e mansas ou doces. Tal classificação está relacionada com o sabor apresentado pelas variedades, sendo as bravas amargas e as mansas, levemente adocicadas (MENZZETE et al., 2009). O sabor amargo está associado ao potencial cianogênico, ou seja, à capacidade da liberação de ácido cianídrico (HCN), substância altamente tóxica (PEREIRA; NERY; IGUE, 1965; PEREIRA; PINTO, 1962). Não há entre os grupos qualquer característica morfológica da planta que permita distingui-los (MUHLEN; MARTINS; ANDO, 2000).

No Brasil a variabilidade genética de mandioca é conservada em bancos de germoplasmas ou em coleções de acesso, distribuídos em todo o país. Apesar da reconhecida importância desses acessos, o germoplasma da mandioca ainda tem sido pouco estudado sob o ponto de vista genético. A escassez de informações, principalmente aquelas relacionadas à documentação e caracterização genética, combinada com a carência de estudos sobre o

conhecimento da diversidade genética dos ecotipos com potencial econômico, faz com que a conservação e caracterização do germoplasma se tornem necessárias para assegurar informações sobre essas fontes de genes para utilização futura. Nesse contexto, os marcadores de DNA constituem técnicas importantes nos estudos de evolução, domesticação, mapeamento genético e caracterização para uso mais eficiente dos acessos no melhoramento genético, além de possibilitar a determinação do valor potencial do material melhorado.

Os marcadores moleculares permitem a avaliação, em curto prazo, de um número elevado de genótipos, além de não sofrerem influência ambiental, como ocorre com marcadores morfológicos (COSTA; CARDOSO; OHAZE, 2003). Portanto, eles têm sido utilizados frequentemente na estimativa da diversidade genética entre acessos de mandioca (COSTA; CARDOSO; OHAZE, 2003; MUHLEN; MARTINS; ANDO, 2000; VIEIRA et al., 2008a). Entre os marcadores moleculares de DNA existentes, os microssatélites apresentam algumas vantagens como, por exemplo: alta reprodutibilidade, simplicidade e rapidez da técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de utilização e grande poder de resolução (OLIVEIRA et al., 2006). Eles ainda possuem maior sensibilidade à variabilidade de locos do que os detectados por RAPD ou AFLP (MUHLEN; MARTINS; ANDO, 2000).

O objetivo deste trabalho foi identificar a variabilidade genética de clones de mandioca existentes na coleção de acessos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), através de microssatélites, e detectar a semelhança molecular com cultivares de mesa e indústria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à classe das Dicotiledôneas, subclasse Archiclamydea, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, tribo Manihoteae, gênero Manihot.

A planta é monoica, com flores femininas e masculinas na mesma inflorescência. As flores femininas são unissexuadas por aborto de estames e a polinização é feita principalmente por abelhas e vespas. As flores femininas amadurecem alguns dias antes das flores masculinas (dicotomia protogínica), e admiti-se, por conseqüência, que a mandioca pertence ao grupo das plantas alógamas (CABRAL, 2001). Taxas de cruzamento de até 91,5% entre ecotipos ou variedades regionais foram observadas, confirmando como alogamia o sistema reprodutivo da mandioca (SILVA, 2000). Seu porte varia entre um a cinco metros e apresenta sistema caulinar subarborescente erecto, podendo ser predominantemente indiviso no ciclo vegetativo e posteriormente ramificado no ciclo reprodutivo. Quando adulto o caule é lenhoso, dotado de nós salientes e apresenta coloração bem variada com as cores (verde, o cinza e a avermelhada). Sua folhas são do tipo simples palmipartidas, alternas com lobos que variam quanto ao formato, cor, tamanho e em número que pode ser de 5 a 9 (CONCEIÇÃO, 1987).

As plantas podem ser oriundas de sementes ou de propagação vegetativa, por meio de segmentos do caule, denominados manivas. A reprodução assexual é usada nos plantios comerciais. Em plantas oriundas de sementes, as raízes apresentam tipo axial tuberoso, ocorrendo algumas vezes a formação de raízes secundárias feculentas. Em plantas propagadas assexuadamente, ocorre o modelo pseudo-fasciculado tuberoso que é o principal

produto de consumo. As raízes são ricas em fécula, apresentando-se sob várias conformações: cilíndricas, cilíndrico-cônicas, cônicas, fusiformes e algumas vezes, globulosas. Em consequência da alogamia as plantas são altamente heterozigóticas (CONCEIÇÃO, 1987).

O gênero foi disseminado do Norte da América do Sul até as Antilhas, América Central, pela parte sul da América do Norte e por todo o território brasileiro (SHMIDT, 1951 citado por CABRAL, 2001). Sua ampla distribuição geográfica varia desde 33 ° de latitude norte até 35 ° de latitude sul (ALLEM, 1999). Além da mandioca, acredita-se que outras plantas cultivadas tais como amendoim (*Arachis hypogaea*), borracha (*Hevea brasiliensis*), mate (*Ilex paraguayensis*) e abacaxi (*Ananás comosa*) são pertencentes ao centro de origem Brasil-Paraguai (MONTALDO, 1979 citado por CABRAL, 2001).

A raiz é a parte mais importante da mandioca sendo aproveitada de diversas formas, tanto na alimentação humana como na alimentação animal e na indústria.

Considerando a raiz, as variedades podem ser divididas em duas classes: mansas, doce ou de mesa, que é consumida “in natura” e possui sabor adocicado; mandioca brava ou amarga, que é utilizada nas indústrias para a produção principalmente de farinha e possui sabor amargo. O sabor amargo está associado ao potencial cianogênico, ou seja, à capacidade da liberação de ácido cianogênico (HCN), substância altamente tóxica (PEREIRA; NERY; IGUE, 1965; PEREIRA; PINTO, 1962). Evidências revelaram que o sabor amargo é perceptível a partir de 100 mg eq. HCN/ kg de poupa de raízes (DUFOUR, 1988; LORENZI et al., 1993). Em estudos de conteúdos cianogênicos em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas, observaram que as mandiocas bravas e de sabor amargo apresentaram teor cianogênico acima de 100 mg eq. HCN/ kg de poupa de raízes e as mandiocas mansas e de sabor adocicado, apresentaram teores cianogênicos

abaixo de 100 mg eq. HCN/ kg de poupa de raízes (VALLE et al., 2004). Seus resultados reforçam as evidências da percepção de sabor amargo ou doce da mandioca em função de seu teor cianogênico.

Alguns estudos sugerem a possibilidade de distinguir mandiocas bravas de mandiocas mansas através de marcadores moleculares. Entretanto, estes ainda são poucos.

Colombo e Valle (1998), usando RAPD, marcadores morfológicos e análise de componentes principais (PCoA), encontraram uma separação clara entre sete variedades de mandiocas mansas e dois grupos de mandiocas bravas, todas originárias do Brasil.

Mkubira, Mahungu e Salipira (1998), usando microsatélite e PCoA, mostraram uma boa separação entre genótipos de mandiocas bravas de mansas.

Variedades com alto teor de HCN, ou bravas, são utilizadas para produzir farinha, extrair amido e outros produtos, mas somente são consumidas após algum tipo de processamento industrial, com efeito, destoxicante. Variedades mansas são mais versáteis, podem ser destinadas ao processamento tais quais as variedades bravas, e também consumidas após preparos mais simples como cozidas, fritas ou assadas (VALLE et al., 2004).

Além dos produtos que têm as raízes como matéria-prima básica, há produtos gerados a partir da parte aérea (constituída de folhas e hastes) que são usados na alimentação animal e humana. Na alimentação animal as folhas e hastes são usadas no preparo de silagens e fenos, ou consumidas mesmo frescas. Podem ser utilizadas nas formas peletizadas, pura ou misturadas com outros alimentos. Na alimentação humana, as folhas, depois de desidratadas, são usadas nas formas de farinhas ou diretamente na preparação de alimento típicos das regiões Norte e Nordeste do Brasil. As hastes são também fontes de material de plantio (manivas) para as novas lavouras (BARROS; MERCÊS; ALVIM, 1978).

2.1.1 Citogenética da mandioca

A grande maioria dos autores que estudaram os cariótipos das espécies do gênero *Manihot*, encontrou 18 cromossomos bivalentes na metáfase I e um desenvolvimento meiótico normal nas demais fases (CONCEIÇÃO, 1987; CRUZ, 1968; SILVA JARDIM, 1984).

Outros estudos sobre o cariótipo do gênero *Manihot* mostraram que, de 98 espécies descritas, apenas em 20 foi determinado o número de cromossomos, como sendo $2n=36$. O número básico de cromossomo para o gênero é de $X=9$ (PERRY, 1943 citado por CABRAL, 2001). Em outro estudo foi verificado o mesmo resultado, quando estudaram as espécies *M. esculenta* e *M. glaziovii* (UMANAH; HARTMANN, 1973). Os autores as definiram como aloploiploides com cariótipos bastante similares, diferindo apenas no segundo par de cromossomos satélites, que apresentaram comprimento médio diferente, sendo $2,2\mu$ em *M. esculenta* e $3,1\mu$ em *M. glaziovii*. A similaridade de cariótipos é considerada uma desvantagem para os estudos citogenéticos e filogenéticos. Entretanto, é uma vantagem para o melhoramento por possibilitar a transferência genética através de cruzamentos interespecíficos.

Dados de mapeamento genético e de segregação de alelos, no entanto, não confirmaram definitivamente a hipótese de origem aloploiplóide. Publicado um mapa genético da mandioca, foram assinalados 132 marcas de RFLP, 30 RAPD, 3 microssatélites e 3 locos isoenzimáticos. Foram identificados 20 grupos de ligação, compreendendo 931,6 cM, cerca de 60% do genoma. Apesar de existir um desvio significativo do número de locos ligados em repulsão em relação ao esperado para um diplóide, não foi possível concluir sobre a existência ou não de cromossomos homeólogos. Encontraram apenas 5% de locos duplicados e todos distribuídos aleatoriamente no genoma (FREGENE et al., 1997).

Em outro estudo, isolaram quatorze microssatélites. Cinco foram associados a pelo menos três grupos de ligação diferentes. Em onze locos havia apenas um ou dois alelos por genoma, como se espera para um genoma diplóide ou completamente diploidizado. Apenas um microssatélite apresentou dois locos e mesmo assim, altamente ligados (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 1998).

2.1.2 Importância, consumo e produção

A mandioca é uma das mais importantes fontes de carboidratos e é consumida por mais e 500 milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais (EL-SHARKAWY, 2006). Com uma produção acima de 170 milhões de toneladas, a mandioca constitui uma das principais explorações agrícolas do mundo. Entre as tuberosas, perde apenas para a batata. Nos trópicos, essa importância aumenta ainda mais (FUKUDA; OTSUBO, 2003).

O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca, com 12,7% do total (Gráfico 1). Cultivada em todas as regiões do país, tem papel importante na alimentação humana e animal, bem como matéria-prima para inúmeros produtos industriais e na geração de emprego e de renda (FUKUDA; OTSUBO, 2003).

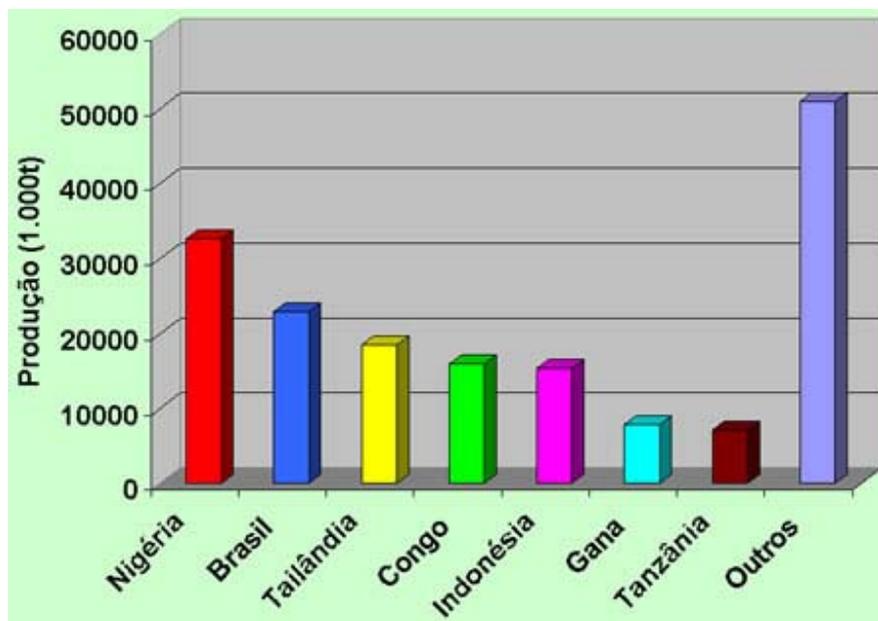


Gráfico 1A Principais países produtores de mandioca em 2000

Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2010)

As Regiões Norte e Nordeste destacam-se como as principais consumidoras. O cultivo é feito sem uso de insumos ou qualquer tecnologia avançada, sendo algumas vezes em consórcio com outras culturas. Grandes variabilidades fenotípicas são observadas entre os materiais cultivados (CABRAL, 2001).

Dentre os principais estados produtores destacam-se: Pará (17,9%), Bahia (16,7%), Paraná (14,5%), Rio Grande do Sul (5,6%) e Amazonas (4,3%), que respondem por 59% da produção do país. A Região Nordeste sobressai-se com uma participação de 34,7% da produção nacional, porém com rendimento médio de apenas 10,6 t/ha. As demais regiões participam com 25,9% (Norte), 23,0% (Sul), 10,4% (Sudeste) e 6,0% (Centro-Oeste). No Sul e Sudeste, com rendimentos médios de 18,8 t/ha e 17,1 t/ha, respectivamente, a maior parte da

produção é para a indústria, principalmente no Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Na região Centro-Oeste, destaca-se a produção de Mato Grosso do Sul, cuja produção se destina, basicamente, para a industrialização, em particular, de fécula (FUKUDA; OTSUBO, 2003).

De uma maneira geral, a produção mundial de mandioca vem crescendo, assim como o aumento da área plantada, porém, o rendimento médio não tem crescido na mesma proporção. Necessidades de se produzirem mais e com melhor qualidade são cada vez mais exigidas para suprir a demanda mundial. Nesse contexto, o melhoramento genético de cultivares pode contribuir para melhorar o rendimento, aumento da resistência a patógenos, produtividade e qualidade dos produtos obtidos (CABRAL, 2001).

O conhecimento da variabilidade contida em cultivos tradicionais, em bancos de germoplasma e em áreas indígenas amplia a possibilidades de se obter variedades mais produtivas e resistentes a pragas ou patógenos, nos cruzamentos e processos de melhoramento genético da cultura.

2.1.3 Diversidade genética entre espécies

A avaliação da diversidade usando marcadores moleculares tem confirmado a grande variabilidade genética da mandioca, mas algumas comparações com espécies selvagens indicam que estas podem conter tanta ou mais variabilidade que a cultivada (MUHLEN, 1999). Estima-se em cerca de 7000 o número de variedades encontradas em todo mundo, em sua maioria variedades regionais, mantidas por agricultores tradicionais (EMPERAIRE; PINTON; SECOND, 1999; SALICK; CELLINESE; KNAPP, 1997).

Estudos analisando a variabilidade genética de 20 plantas de *M. glaziovii*, 20 clones de mandioca e 49 clones da chamada mandioca-de-árvore, de materiais coletados na Nigéria, foi realizado utilizando polimorfismo de 13

locos isoenzimáticas. No estudo, encontraram maior diversidade entre os clones de mandiocas-de-árvore, seguido das *M. glaziovii*, e por fim com menos variabilidade, os clones de mandiocas. A distribuição de alelos e indicadores morfológicos sugeriu que a mandioca-de-árvore seria um híbrido natural entre as duas espécies (WANYERA; HANH; AKEN'OVA, 1994).

Olsen e Schaal (1999) analisaram a seqüência de nucleotídeos de loco (G3pdh) de 157 plantas coletadas em 27 populaçõ de *M. esculenta ssp. flabellifolia*, 35 plantas de 6 populações de *M. pruinosa* e 20 acesso de mandioca. Eles encontraram 28 haplótipos, destes, 6 na mandioca, 23 em *M. esculenta ssp. flabellifolia* e 7 em *M. pruinosa*. Apesar do desequilíbrio numérico da amostragem, observou-se que a *M. pruinosa* tinha um número equivalente de haplótipos em relação à mandioca e que a *M. esculenta ssp. flabellifolia* tinha cerca de três vezes mais haplótipos. A distribuição dos haplótipos entre as populações de *M. esculenta ssp. flabellifolia* não foi igual, havendo maior diversidade entre as populações localizadas AM MT, RO e AC do que em TO e GO.

Em estudos de diversidades genética, usando bandas polimórficas de RAPD, foram encontrados valores médios de similaridade (Jaccard) de $S= 0,63$ para 10 acessos de *M. esculenta ssp. flabellifolia* e $S= 0,57$ para 6 acessos de *M. esculenta ssp. peruviana*. Para o conjunto de 16 plantas o valor médio foi $S= 0,61$, variando de 0,38 a 0,81. Para 20 acessos de mandioca da coleção mundial o valor médio de similaridade foi $S= 0,66$, variando de 0,51 a 0,84. Utilizando 13 variedades tradicionais da localidade de Santa Isabel, na Amazônia, o valor médio observado foi de $S= 0,70$, variando de $S= 0,55$ a 0,81. Entretanto, para as mesmas plantas e utilizando bandas polimórficas de AFLP, observou média de similaridade de 0,64 para o grupo de flabellifolia/peruviana com variações, mínima e máxima, de 0,33 a 0,84. Na coleção mundial observou média de $S= 0,72$, variando de 0,56 a 0,88. Para as variedades da localidade de Santa Isabel,

observou média de similaridade de 0,71, variando de 0,52 a 0,79 (COLOMBO, 1997; COLOMBO; VALLE, 1998).

Muhlen, Martins e Ando (2000) avaliaram 45 ecotipos de mandioca provenientes da Amazônia, 9 do litoral sul do Estado de São Paulo e uma variedade moderna, a Mantiqueira. No estudo foram utilizados bandas polimórficas de RAPD, AFLP e microssatélites. Utilizando RAPD foi observada uma média de similaridades de $S=0,89$, variando de 0,81 a 0,99. Utilizando AFLP, observou uma média de $S=0,85$, variando de 0,75 a 1,00. E com os microssatélites, observou uma média de similaridade de 0,59, variando de 0,24 a 1,00. Em função do maior polimorfismo encontrado para o microssatélites, tanto o índice médio de similaridades como a amplitude de variação entre mínimo e máximo, refletiram uma variabilidade genética maior que a encontrada por meio de RAPD e AFLP.

Costa, Cardoso e Ohaze (2003) avaliaram 27 acessos de mandioca provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém – PA. No estudo utilizaram bandas polimórficas de RAPD e os valores de similaridades variaram de $S= 0,03$ a 0,78.

Vieira et al. (2008b) avaliaram a variabilidade genética de 356 acesso do Banco de Germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados. Para tal, foram utilizados 27 descritores morfológicos. Os resultados de dissimilaridade genética média intragrupos variaram 0,30 a 0,41.

Em outro estudo, Vieira et al. (2008a) avaliaram a divergência genética entre 4 acessos açucarados e 4 acessos não-açucarados. Nesse estudo, utilizaram 3 métodos para avaliar a variabilidade genética: Distância generalizada de Mahalanobis, Complemento do Índice de coincidência simples e por marcadores RAPD. Observaram nos resultados variação significativas entre os acessos testados. Os valores de dissimilaridades genéticas entre os acessos variaram de 0,04 a 0,79.

2.1.4 Bancos de germoplasma

A mandioca apresenta grande variabilidade genética, isto porque a propagação vegetativa através de estacas (manivas) favorece o aparecimento e a fixação de numerosas cultivares nas regiões tropicais. Estes novos genótipos têm grande potencialidade para serem aproveitados no melhoramento genético da cultura. Neste contexto, a coleta, preservação e caracterização de germoplasma previnem a erosão genética dos cultivos e asseguram a variabilidade genética imprescindível aos programas de melhoramento (CABRAL, 2001). Ainda segundo esse autor, em mandioca, a erosão ocorre principalmente em decorrência da expansão das fronteiras agrícolas, lançamentos de novas cultivares, desmatamento, e dos estresses bióticos e abióticos.

O germoplasma de mandioca no Brasil tem sido pouco explorado sob o ponto de vista genético, devido principalmente à falta de estudos preliminares a respeito da potencialidade dos genótipos. Caracterizações e documentações adequadas permitem a utilização mais racional de germoplasma nos programas de melhoramento e facilitam o intercâmbio do material e de informações (FUKUDA et al., 1996).

Segundo Costa, Cardoso e Ohaze (2003), os acessos de mandioca do Brasil estão distribuídas em sete bancos ativos de germoplasma regionais, localizados na Amazônia (Oriental e Ocidental), Tabuleiros Costeiros, Semi-árido, Cerrados, Subtrópico e em Campinas-SP. Só pra exemplificar o tamanho dessa responsabilidade, bancos de germoplasma, como o Banco Regional de Germoplasma da Mandioca do Cerrado (BGMC), que reúne cerca de 500 acessos das espécies *M. esculenta* Crantz, constitui uma importante fonte de genes para programas de melhoramentos genéticos (VIEIRA et al., 2007).

O aumento da produtividade, da resistência a patógenos e tolerância a pragas, são as características mais importante na cultura da mandioca, portanto

constituem os principais objetivos dos programas de melhoramento genético da cultura (CABRAL, 2001). Ainda, segundo esse autor, várias instituições como IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) em São Paulo, EMBRAPA Mandioca, e Fruticultura (EMBRAPA-CNPMP) na Bahia e o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) na Colômbia, vêm desenvolvendo pesquisas empregando técnicas modernas, objetivando lançamentos de cultivares melhoradas de mandiocas.

2.1.5 Caracterização dos acessos

O melhoramento genético de plantas está relacionado ao grau de variabilidade genética disponível nas populações de interesse, possuindo papel fundamental nos programas de cruzamento e seleção genéticos promissores. Portanto, é importante conhecer a maneira como essa variabilidade está distribuída entre as diferentes populações, e em seus habitats naturais. É essencial conhecer a estrutura genética e o comportamento reprodutivo das populações, uma vez que os padrões de distribuição da variabilidade genética estão correlacionados com o sistema reprodutivo (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002).

Portanto, cada vez mais, é necessário que o pesquisador conheça o germoplasma disponível em relação à variabilidade do desempenho agrônomo, para que essas informações sejam utilizadas como ponto de partida nos programas de melhoramento genéticos, definindo assim, quais acessos serão incluídos na etapa de avaliação agrônomo (VIEIRA et al., 2008b).

Os bancos de germoplasma, normalmente são constituídos por variedades antigas (ecotipos), variedades silvestres do mesmo gênero da cultura. Em função de reunirem ao mesmo tempo constituições genéticas de diferentes origens e de diferentes níveis de melhoramento, podem constituir-se em ótimas

fontes de genes para programas de melhoramento. Entretanto, para que toda essa variabilidade seja utilizada com frequência e eficiência, é necessário que o pesquisador conheça o germoplasma disponível em relação à variabilidade e ao desempenho agronômico (VIEIRA et al., 2008b).

A caracterização do germoplasma é o ponto de partida para que o pesquisador defina quais acessos serão incluídos na etapa de avaliação agronômica (HIDALGO, 2003). Essa caracterização pode ser realizada por meio do emprego de caracteres fenotípicos (agronômicos e descritores moleculares), dados de passaporte e marcadores moleculares (VIEIRA et al., 2008b).

2.1.6 Marcadores moleculares

A utilização de marcadores moleculares na caracterização de germoplasma de mandioca vem crescendo nos últimos anos, principalmente em função de estes não sofrerem influência do ambiente e possibilitarem a geração de uma grande quantidade de informação referente ao genoma da espécie (CARVALHO; SCHALL, 2001; MUHLEN; MARTINS; ANDO, 2000; ZACCARIAS et al., 2004). Entretanto, o custo dessa metodologia ainda é o principal entrave para a utilização dela em larga escala (VIEIRA et al., 2008b). Contudo, graças ao desenvolvimento de algumas técnicas de genética molecular, variações nas diferentes seqüências de nucleotídeos do DNA podem ser detectadas e usadas como marcadores em estudos de filogenia e genética de populações, possibilitando maior precisão do que os marcadores morfológicos (MÜHLEN, 1999).

Os marcadores moleculares vieram para auxiliar e agilizar os trabalhos de melhoramento genético, visto que inicialmente a variabilidade genética era explorada pela intuição do agricultor (HARLAN; WET, 1971). O patrimônio genético acumulado ao longo das gerações passou a ser utilizado com mais

freqüência, provocando mudanças fenotípicas que atendem as necessidades do homem, principalmente em mandioca, espécie que faz parte da agricultura autóctone do Brasil.

O RFLP, descrito no final da década de 70, é um marcador de DNA baseado no padrão de fragmentos produzidos pela digestão de DNA por meio de endonuclease específica (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002). O desenvolvimento das técnicas de marcadores de DNA por meio de RFLP propiciou um avanço significativo no conhecimento da biossimetria, evolução e genética de plantas e animais. Associação entre a sensibilidade da técnica e a descoberta de regiões com variabilidade têm possibilitado avanços em estudos de genética de populações, biogeografia e polimorfismo em populações de diversos organismos, em particular em populações humanas, onde têm sido aplicadas na medicina forense, na determinação de paternidade e no diagnóstico de doenças hereditárias (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Os marcadores do tipo RFLP apresentam algumas vantagens em relação aos marcadores do tipo citológico, morfológico ou isoenzimáticos, pois são herdados como marcadores mendelianos livres de efeitos pleitrópicos, não são afetados pelo ambiente, podem ser obtidos em números elevados e têm distribuição aleatória no genoma (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002).

O termo minissatélite significa um tipo de DNA repetitivo freqüentemente encontrado em organismos eucariotos. Consiste de pequenas seqüências que se repetem uma ao lado da outra, (em Tandem) várias vezes. O número de vezes que a seqüência se repete varia entre indivíduos. A variação individual no número de vezes que determinada seqüência é repetida caracteriza o polimorfismo genético (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002).

A análise de polimorfismo de minissatélite com sondas de locos múltiplos é utilizada em medicina forense, em teste de paternidade, identificação de criminosos e esturpadores. Em vegetais é utilizada na identificação de acessos

para fins de registro de patentes, proteção de cultivares e identificação de material transgênico (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002).

Polimorfismos de microssatélites são detectados por hibridação. Tautz e Renz (1984) propuseram o termo seqüências simples repetidas (SSR), para descrever o tipo de DNA fragmentado em organismo eucarióticos, denominado microssatélites. Como nos minissatélites, o número de vezes que uma determinada seqüência (de dois a dez pares de base) se repete, varia de indivíduo para indivíduo, evidenciando o polimorfismo genético. Microssatélites também podem ser detectados através de PCR (reação de polimerase em cadeia) além da estratégia de hibridação (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002).

Os principais marcadores de DNA usados atualmente baseiam-se na reação de polimerase em cadeia (PCR). A técnica de PCR foi desenvolvida no final da década de 80 por Mullis e Faloona (1987), que permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado seguimento de DNA. O desenvolvimento dessa técnica aumentou a eficiência de detecção de polimorfismo em nível de DNA e RNA. Além disso, reduziu o tempo de execução dos experimentos, custos e complexidade (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002).

Aplicam-se técnicas de PCR, como RAPD, AFLP e Microssatélites, com variações, a vários campos da biologia incluindo genética, botânica, entomologia e etc. Atualmente, é técnica amplamente difundida, sendo utilizados em universidades, institutos de pesquisas, empresas particulares e em áreas bastante distintas. São as técnicas mais utilizadas na análise de polimorfismo (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002).

A técnica denominada RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) ou reação em cadeia de polimerase iniciada arbitrariamente, para detecção de polimorfismo no DNA, foi inicialmente descrita por Williams *et al.*, 1990 e Welsh & McClelland, 1990. Baseia-se em amplificação de fragmentos de DNA por PCR, seguida de separação dos fragmentos amplificados, segundo seu

tamanho, por meio de eletroforese em meio semisólido (normalmente gel de agarose) e sua visualização (normalmente por coloração com brometo de etídeo e exposição a luz ultravioleta) (MÜHLEN, 1999). São amplificados fragmentos de DNA não identificados a princípio. Utilizam como iniciadores (“Primers”), oligonucleotídeos (frequentemente decâmeros) de composição arbitrária, que podem ter homologia total ou parcial com uma ou mais regiões no genoma. O seu pareamento com o DNA molde direciona a ação da DNA polimerase para o trecho contínuo à região de homologia (MÜHLEN, 1999).

O problema da técnica de RAPD é a dificuldade de padronização, uma vez que deve existir discriminação exata entre a presença de um sítio RAPD que hibridiza com o *primer* para que o polimorfismo possa ser detectado. Alterações dos resultados em função das condições do PCR, também são problemas acarretados no uso dessa técnica (MÜHLEN, 1999). Os principais fatores descritos que afetam o padrão de bandas são a concentração de $MgCl_2$, de DNA molde e de nucleotídeos na solução, o tipo de polimerase, o tipo de termociclador, a temperatura de anelamento e por fim, a composição e o comprimento dos iniciadores (COLOMBO; SECOND; VALLE, 1997; MÜHLEN, 1999).

Estudos detalhados de todos estes fatores demonstraram que há maior ou menor interferência de cada fator nos padrões de bandas obtidos e que é necessário observar certos limites de variação para cada fator de modo a conseguir reprodutibilidade nos resultados (WILLIAMS; RAFALSKI; TINGEY, 1993).

Quanto ao polimorfismo, ele é caracterizado quando há presença de banda em um indivíduo e ausência no outro, após a amplificação e eletroforese em gel. O padrão de bandas observado normalmente nessa técnica é do tipo dominante, pois são amplificadas ao mesmo tempo, mais de uma região de genoma, não se fazendo distinção entre bandas provenientes de um mesmo loco

com diferentes alelos e bandas provenientes de diferentes locos (CHALMERS et al., 1992; WILLIAMS; RAFALSKI; TINGEY, 1993).

Dois tipos de polimorfismo podem ser detectados por esse método. Alterações suficientemente grandes na região de homologia do iniciador para que não haja mais pareamento ou o pareamento seja muito dificultado. Neste caso não haverá amplificação desta região, ou a amplificação será insuficiente para uma boa visualização da banda resultante (WILLIAMS et al., 1990). O outro tipo de polimorfismo detectado refere-se à alteração de nucleotídeos, resultando no aparecimento de bandas com diferente comportamento eletroforético (QUIROS; TRUCO; HU, 1995). Em mandioca esta técnica vem sendo utilizada eficientemente pelos pesquisadores para avaliar o nível de diversidade genética (COSTA; CARDOSO; OHAZE, 2003; MÜHLEN; MARTINS; ANDO, 2000; SOUZA et al., 2008; VIEIRA et al., 2008b).

A técnica AFLP foi descrita inicialmente por Van Der Put et al. (1995) e Vos et al. (1995). Está baseada na amplificação por PCR de fragmentos aleatórios do genoma, como na técnica de RAPD. O termo AFLP significa polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (*amplified fragment length polymorfism*). A técnica permite que fragmentos aleatórios do genoma sejam amplificados por PCR após terem sido originados pela digestão do genoma por enzimas de restrição. As principais etapas que envolvem a detecção dos fragmentos de AFLP resumem-se na digestão do genoma pela enzima de restrição, na ligação de “adaptadores” aos fragmentos gerados e na amplificação dos fragmentos a partir de *primers* que hibridizam com os adaptadores (MÜHLEN, 1999). Durante o processo, para aumentar a quantidade de fragmentos amplificados em uma única reação, realiza-se uma clivagem do DNA com duas enzimas de restrição. As enzimas que reconhecem muitos sítios no genoma vão gerar maior número de fragmentos que serão depois

amplificados. Já as enzimas que reconhecem sítios raros vão gerar menor número de fragmentos para amplificação (MÜHLEN, 1999).

Todos os fragmentos produzidos pela clivagem têm extremidades iguais e conhecidas. A estas extremidades se acrescenta um pequeno fragmento de DNA de fita dupla, com cerca de 15 pares da base, chamado adaptador. A ligação dos adaptadores aos fragmentos é feita por uma enzima, normalmente a ligase T4. A função dos adaptadores é propiciar o pareamento dos iniciadores com os fragmentos de DNA que servirão do molde, na reação de PCR. As seqüências de nucleotídeos dos adaptadores são complementares às dos iniciadores (MÜHLEN, 1999).

Depois de feita a clivagem e a ligação dos adaptadores, os fragmentos de DNA são amplificados por PCR. Os iniciadores usados nesta reação podem estar marcados para permitir a visualização dos fragmentos amplificados. Os processos mais utilizados são radioatividade e fluorescência. Também é possível usar iniciadores não marcados e fazer uma coloração posterior do gel com nitrato de prata (MÜHLEN, 1999).

Normalmente, a amplificação é feita em duas etapas. Na primeira, chamada de pré-amplificação ou PCR+1, a reação de PCR é feita com iniciadores que além da seqüência homóloga à dos adaptadores, possuem um nucleotídeo a mais, avançando para o interior do fragmento a ser amplificado. Numa segunda rodada de amplificação, denominada amplificação seletiva ou PCR +2 (ou PCR +3), os iniciadores usados têm dois ou três nucleotídeos a mais que a seqüência do adaptador. A finalidade destes nucleotídeos excedentes é limitar o número fragmentos a amplificar, para que os padrões de bandas produzidos sejam passíveis de uma boa separação e visualização. Somente aqueles que apresentarem homologia, além da região adaptadora, também com estes nucleotídeos excedentes, serão amplificados (MÜHLEN, 1999).

Observa-se, portanto, que a diferença fundamental entre as técnicas de RAPD e AFLP é que na técnica RAPD, a seleção das regiões que serão amplificadas é feita em função de homologia com os oligonucleotídeos usados como iniciadores. Já na AFLP, a seleção primária das regiões que serão amplificadas é feita em função da existência de sítios reconhecidos por enzimas de restrição. A frequência de sítio de restrição, com quatro ou cinco pares de bases é muito maior que dos sítios homólogos aos iniciadores de RAPD, com dez pares de bases. Por isso detectam-se mais polimorfismos por reação de PCR pela técnica de AFLP do que pela técnica RAPD (MÜHLEN, 1999).

Alguns mapas genéticos de plantas com a localização de marcas de AFLP são conhecidos. Spada et al. (1998) mapearam 18 bandas no genoma de *Asparagus officinalis*. Virk, Ford-Lloyd e Newbury (1998) incorporam 150 marcas de AFLP a um mapa baseado em RFLP de *Oryza sativa*. Cho et al. (1998) prepararam um mapa integrado com marcas de AFLP, SSLP e RFLP também em *Oryza sativa* (MÜHLEN, 1999). Todos estes trabalhos indicam que há uma amostragem razoável dos genomas, com as marcas de AFLP sendo distribuídas por todos os grupos de ligação (MÜHLEN, 1999).

2.1.6.1 Marcadores de Microssatélites

Microssatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) – repetições de seqüências simples) e STRs (*short tandem repeats*) – repetições curtas em tandem) são trechos do genoma compostos pela repetição de uma seqüência curta e simples de nucleotídeos. As seqüências repetidas que compõem os microssatélites normalmente são mono, di, tri e tetra nucleotídeos (TAUZ; TRICK; DOVER, 1986; WEBER; MAY, 1989).

As características que favorecem o uso dos microssatélites como marcadores de DNA são a alta frequência e ampla dispersão pelo genoma e a

alta taxa de mutação a que estão sujeitos, resultando em grande variabilidade (MÜHLEN, 1999).

O número de microssatélites varia de acordo com o tipo de seqüência e a espécie em que é encontrada. Kruglyak et al. (1998), analisando seqüências do genoma humano, de camundongo, da mosca da fruta e de leveduras encontraram seqüências compostas por dinucleotídeos com até 34 cópias, trinucleotídeos com até 26 cópias e tetranucleotídeos com 18 cópias. O genoma de camundongo nos três casos foi o que apresentou microssatélites mais longos, seguido do genoma humano, levedura e mosca da fruta.

A alta variabilidade dos locos de microssatélites está relacionada à freqüência com que ocorrem deleções ou adições da unidade repetitiva, durante as replicações do DNA. Um modelo tem sido proposto para explicar a alta incidência de mutações deste tipo nos locos de microssatélites. Trata-se do chamado deslizamento (do inglês “slippage”) da DNA polimerase no processo de duplicação do DNA. Este fenômeno foi observado *in vitro* e supõe-se que ocorra igualmente *in vivo*, sendo a principal causa do aparecimento de variantes de comprimento nos locos de microssatélites (HITE; ECKERT; CHENG, 1996; WIERDILL; DOMINSKA; PETES, 1997).

Quanto à distribuição física dos microssatélites nos cromossomos de plantas, um estudo detalhado em *Beta vulgaris* L. foi realizado por Schmidt e Heslop-Harrison (1996). No estudo, utilizaram hibridação *in situ* e hibridação em DNA clivado com diversas enzimas de restrição. Escolheram-se sondas complementares a sete tipos de microssatélites (três tetrâmeros, três dímeros, e um trímero). Cada microssatélite apresentou um padrão específico de distribuição no genoma. E foi observada exclusão de alguns microssatélites de regiões de DNA ribossômico, de alguns centrômeros e algumas regiões intercalares.

Em relação aos estudos de polimorfismo, duas metodologias podem ser usadas: hibridação de sondas que contenham seqüências repetitivas ou ampliações por PCR de locos contendo microssatélites (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002). A mais empregada é a técnica PCR. Em estudos de mandioca esse marcador tem sido utilizado principalmente para detecção de polimorfismo, estudos de evolução, origem e domesticação da mandioca (OLSEN; SCHAAL, 2001), relações filogenéticas (CARVALHO; SHALL; FUKUDA, 2000), grau de parentesco entre as espécies silvestre do gênero *Manihot* e a cultivada (CABRAL; CARVALHO; SCHAAL, 2000), mapeamento do genoma (FREGENE et al., 2000) caracterização e identificação de acessos e ecotipos presentes nos bancos de dados de germoplasma (CARVALHO; SCHALL, 2001; MÜHLEN, 1999) e avaliação de diversidade genéticas (VIEIRA et al., 2009).

A amplificação de locos de microssatélites normalmente é feita usando-se iniciadores complementares às seqüências flanqueadoras do microssatélite. Normalmente usam-se iniciadores com cerca de 20 nucleotídeos que gerem produtos de amplificação com 100 e 400 pb, incluindo microssatélite alvo (MÜHLEN, 1999).

Para definir a seqüência de nucleotídeos dos iniciadores que serão usados para amplificação de cada loco, é necessário conhecer as seqüências das regiões flanqueadoras e desenhar os oligonucleotídeos mais adequados para a amplificação da região. Isto pode ser conseguido pesquisando bancos de seqüências do DNA ou seqüências clones positivos para presença de microssatélites, de bancos de DNA da espécie em estudo (LAGERCRANTZ; ELLEGREN; ANDERSON, 1993). A separação dos fragmentos amplificados que contêm microssatélites normalmente é feita em géis de poliacrilamida, por permitirem resolução de fragmentos que diferem em tamanho por apenas um ou dois nucleotídeos. A visualização pode ser feita por coloração com nitrato de prata, autoradiografia ou fluorescência (MÜHLEN, 1999).

Os microssatélites são marcadores moleculares do tipo codominante, ou seja, todos os alelos são identificados. Com isso, se o indivíduo é diplóide, a amplificação do loco apresentará uma banda se o indivíduo for homozigoto e duas bandas se heterozigoto (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002). Os marcadores do tipo microssatélites apresentam maior conteúdo informativo, por apresentar natureza multialélica, herança codominante, ampla distribuição no genoma e possibilidade de detectar variações de seqüências por meio de PCR, como RAPD e AFLP, e podendo ser transferíveis de genoma para genoma dentro da mesma espécie e entre espécies geneticamente relacionadas (GRATTAPAGLIA, 2001). Normalmente, em mandioca, a metodologia é utilizada para detectar a ligação entre marcadores moleculares e locos de herança simples ou QTL (“Quantitative Trait Loci”), envolvendo análises de população F2 e retrocruzamentos que segregam para a expressão do caráter e para os marcadores. O objetivo principal está relacionado à identificação de genótipos contrastantes para o caráter de interesse com o loco de marcador molecular (FARALDO; SILVA; VEASEY, 2002).

Entre os possíveis problemas na análise de polimorfismos de microssatélites, a manifestação, *in vitro*, da tendência dos microssatélites em sofrerem adições e deleções de sua unidade repetitiva, pode ter como conseqüência a formação de bandas espúrias nos géis, dificultando a interpretação dos resultados. Alguns tipos de seqüência repetitiva dos microssatélites são especialmente susceptíveis a este efeito (MÜHLEN, 1999). A determinação do tamanho exato dos fragmentos amplificados também pode ser prejudicada pela adição, pela polimerase, de um nucleotídeo excedente na extremidade 3' dos fragmentos produzidos. Nem todos os tipos de enzimas, porém, produzem este efeito e como todas as bandas ficam aumentadas de um nucleotídeo, a avaliação relativa dos padrões num gel não é seriamente prejudicada (HITE; ECKERT; CHENG, 1996).

Os fragmentos produzidos por PCR na amplificação dos microssatélites incluem, além do próprio microssatélite, seqüências flanqueadoras situadas entre o microssatélite e as regiões de homologia com os iniciadores. Alterações nestas regiões também podem colaborar com a variação no tamanho dos fragmentos amplificados (AKAGI et al., 1998).

REFERÊNCIAS

- AKAGI, H. et al. Origin and evolution of twin microsatellites in the genus *Oryza*. **Heredity**, London, v. 81, n. 2, p. 187-197, Aug. 1998.
- ALLEM, A. C. A new species of *Manihot* (Euphorbiaceae) from the Brazilian Amazon. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 160, n. 1, p. 181-187, Jan. 1999.
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 14, p. 143-161.
- BARROS, R. S.; MERCÊS, W. C.; ALVIM, R. Sink strength and cassava productivity. **HortScience**, Alexandria, v. 13, n. 4, p. 474-475, Aug. 1978.
- CABRAL, B. L. R. **Variabilidade isoenzimática de 200 acessos de mandioca (*Manihot esculente* Crantz)**. 2001. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2001.
- CABRAL, G. B.; CARVALHO, L. J.; SCHAAL, B. A. Relationship analysis of closed related species to cassava (*Manihot esculente* Crantz) based on microsatellite-primed PCR. In: CASSAVA BIOTECHNOLOGY: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, 4., 2000, Salvador. **Proceeding...** Brasília: Embrapa, 2000. p. 36-50.
- CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, n. 1, p. 133-142, June 2001.

CARVALHO, L. J. C. B.; SHALL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. Phenetic relationships and genetic diversity among cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces revealed by PCR-based markers. In: SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília: Embrapa, Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 65-79.

CHALMERS, K. J. et al. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers. **Heredity**, London, v. 69, n. 5, p. 465-472, Nov. 1992.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. et al. Microsatellites in cassava (*Manihot esculente* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 3, p. 493-501, Aug. 1998.

CHO, Y. O. G. et al. Integrated map of AFLP, SSLP and RFLP makers using a recombinant inbred population of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 3, p. 370-380, Aug. 1998.

COLOMBO, C. **Etude de La diversité génétique de maniocs américains (*Manihot esculenta* Crantz) par les marqueurs moléculaires (RAPD et AFLP)**. 1997. 161 p. Thèse (Doctorat) – Ecole Nationale Supérieur Agronomique de Montpellier, Montpellier, 1997.

COLOMBO, C. et al. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 105-113, mar. 1998.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T. L. Diversidade genética de mandiocas americanas (*Manihot esculente* Crantz) pelos marcadores moleculares RAPD e AFLP. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 258, 1997. Suplemento.

COLOMBO, C.; VALLE, T. L. AFLP e RAPD markers for study the genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 17, p. 14, 1998. Suplemento.

CONCEIÇÃO, A. J. **A mandioca**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1987. 382 p.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 158-164, jan. 2003.

CRUZ, N. D. Citologia no gênero *Manihot* Adams. I: determinação do número de cromossomos em algumas espécies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 91-95, mar. 1968.

DUFOUR, D. L. Cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Euphorbiaceae) cultivars used by Tukanoan Indians in northwest Amazônia. **Economic Botany**, Bronx, v. 42, n. 2, p. 255-266, Apr./June 1988.

EL-SHARKAWY, M. A. International research on cassava photosynthesis, productivity, eco-physiology, and responses to environmental stresses in the tropics. **Photosynthetica**, Prague, v. 44, n. 4, p. 481-512, Dec. 2006.

EMPERAIRE, L.; PINTON, F.; SECOND, G. Gestion dynamique de la diversité du manioc en amazonie du Nord-Ouest. **Natures Sciences Sociétés**, Paris, v. 6, n. 2, p. 27-42, 1998.

FARALDO, M. I. F.; SILVA, R. M.; VEASEY, E. A. Marcadores moleculares em mandioca. In: _____. **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americano**. Piracicaba: Fundação Cargill, 2002. cap 6, p. 100-115.

FERREIRA, C. F. et al. Molecular characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 23-29, mar. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Cassava**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 13 mar. 2010.

FREGENE, M. et al. Genome mapping in cassava (*Manihot esculente* Crantz, Euphorbiaceae): discovery, inheritance, variability and using for gemoplasm characterization. In: CASSAVA BIOTECHNOLOGY INTERNACIONAL CIENTIFIC MEETING, 4., 2000, Salvador. **Proceedings...** Brasília: Embrapa, 2000. p. 192-201.

FREGENE, M. et al. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculente* Crantz). **Theoretical and Applied Genética**, Berlin, v. 95, n. 3, p. 431-441, Aug. 1997.

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil: importância econômica. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, jan. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/referencias.htm>. Acesso em: 20 out. 2009.

FUKUDA, W. M. G.; COSTA, I. R. S.; SILVA, S. O. **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Cruz das Almas: Embrapa, 2005. 4 p. (Circular Técnica, 74).

FUKUDA, W. M. G. et al. **Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1996. 103 p. (Documentos, 68).

GRANER, E. E. **Contribuição para o estudo citológico da mandioca**. Piracicaba: ESALQ, 1935. 28 p.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores genéticos em espécies florestais: *Eucaliptus* como modelo. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento**. Porto Alegre: Pallotti, 2001. cap. 30, p. 967-993.

HARLAN, J. R. Evolutionary dynamics of plant domestication. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 41, n. 1, p. 337-343, 1969. Supplement.

HARLAN, J. R.; WET, N. J. de. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Berlin, v. 20, n. 4, p. 509-517, Aug. 1971.

HIDALGO, R. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. In: FRANCO, T. L.; HIDALGO, R. (Ed.). **Análisis estadístico de datos de caracterización morfológico de recurso fitogenéticos**. Cali: IPGRI, 2003. p. 89-96.

HITE, J. M.; ECKERT, K. A.; CHENG, K. C. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)_n-d(G-T)_n microsatellite repeats. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 2429-2434, 1996.

KRUGLYAY, S. et al. Equilibrium distributions of microsatellite repeat resulting from a balance between slippage events and point mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 18, p. 10774-10778, Sept. 1998.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 1111-1115, Mar. 1993.

LORENZI, J. O. et al. Teor de ácido cianídrico em variedades de mandioca cultivadas em quintais do Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 52, n. 1, p. 1-5, jun. 1993.

MARTINS, P. S. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 219-223, mar. 1994. Suplemento.

MEZETTE, T. F. et al. Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agronômicas, tecnológicas e químicas. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 601-605, set. 2009.

MKUMBIRA, J.; MAHUNGU, N. M.; SALIPIRA, K. L. Distribution of hydrogen cyanide in cassava germplasm in Malawi. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 17, p. 75, 1998. Suplemento.

MONTATALDO, A. **La yuca o mandioca**. San José: Editorial IICA, 1979. 386 p.

MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovariedades de mandioca (Manihot esculente Crantz)**. 1999. 176 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1999.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 319-328, abr./jun. 2000.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 155, p. 335-350, 1987.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, jun. 2006.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of sciences from the United States of America**, Washington, v. 96, n. 10, p. 5586-5591, May 1999.

OLSEN, K. M.; SCHALL, B. A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazon origin of domestication. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 1, p. 131-142, Jan. 2001.

PEREIRA, A. S.; NERY, J. P.; IGUE, T. Seleção de novos clones de mandioca para mesa, pela toxicidade e paladar de suas raízes "in natura". **Bragantia**, Campinas, v. 24, n. 10, p. 40-48, jun. 1965.

PEREIRA, A. S.; PINTO, M. G. Determinação da toxicidade da mandioca pelo paladar das raízes "in natura". **Bragantia**, Campinas, v. 21, p. 146-151, out. 1962.

PERRY, B. A. Chromosome number and phylogenetic relationship in the Euphorbiaceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 30, n. 7, p. 527-543, July 1943.

QUIROS, C. F.; TRUCO, M. J.; HU, J. Sequence comparison of two codominant RAPD markers in *Brassica nigra*: deletion, substitutions and microsatellites. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 3/4, p. 268-270, Dec. 1995.

SALICK, U.; CELLINESE, N.; KNAPP, S. Indigenous diversity of cassava: generation, maintenance, use and loss among the Amuesha, Peruvian upper Amazon. **Economic Botany**, Bronx, v. 51, n. 1, p. 6-19, Jan./Mar. 1997.

SCHMIDT, C. B. A mandioca: contribuição para o conhecimento de sua origem. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 52, p. 53-128, 1951.

SCHMIDT, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. **Proceedings of the National Academy of Sciences from the United States of America**, Washington, v. 93, p. 8761-8765, Aug. 1996.

SILVA JARDIM, J. R. **Hibridação interespecífica no gênero Manihot Adams**. 1984. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1984.

SILVA, R. M. **Sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade em roças de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz)**. 2000. 131 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2000.

SOUZA, F. R. O. et al. Variabilidade genética entre acessos de mandioca de indústria acessada por meio de marcadores RAPD. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: PariaMundi, 2008. CD-ROM.

SPADA, A. et al. A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 7, p. 1083-1089, Nov. 1998.

TAKAHASHI, M.; GONÇALO, S. **A cultura da mandioca**. Paranavaí: Olímpica, 2005. 116 p.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, May 1984.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, London, v. 322, n. 6080, p. 652-656, Aug. 1986.

UMANAHA, E. E.; HARTMANN, R. W. Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot species*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 98, n. 3, p. 272-274, 1973.

VALLE, T. L. et al. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 221-226, maio/ago. 2004.

VAN DER PUT, N. M. J. et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: additional risk factor neural-tube defects? **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 62, n. 5, p. 1044-1051, May 1995.

VIEIRA, E. A. et al. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1707-1715, dez. 2008a.

VIEIRA, E. A. et al. **Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do cerrado acessada por meio de descritores morfológicos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 15 p.

VIEIRA, E. A. et al. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 56-67, 2008b.

VIEIRA, L. J.; ALVES, A. A. C.; DALTRO, P. S. Avaliação da diversidade genética de variedades de mandioca utilizando marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13., 2009, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Campus Lageado, 2009. p. 626-631.

VIRK, P. S.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, J. H. Mapping AFLP markers associated with sub-specific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and an investigation of segregation distortion. **Heredity**, London, v. 81, p. 613-620, 1998.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANYERA, N. M. W.; HANH, S. K.; AKEN'OVA, M. E. Introgression of ceara rubber (*Manihot glaziovii* Muell-Arg) into cassava (*M. esculenta* Crantz): a morphological and electrophoretic evidence. In: TRIENNIAL SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 15., 1994, Kampala. **Proceedings...** Ibadan: ISTRC, 1994. p. 125-130.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 388-396, Mar. 1989.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WIERDL, M.; DOMINSKA, M.; PETES, T. D. Microsatellites instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. **Genetics**, Austin, v. 146, n. 3, p. 769-779, July 1997.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 218, p. 706-740, 1993.

ZACARIAS, A. M. et al. Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculente* Crantz) GERMOPLASM FORM Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica**, Wageningen, v. 138, n. 1, p. 49-53, July 2004.

CAPITULO 2

**CARACTERIZAÇÃO DE CLONES DE MANDIOCA UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

RESUMO

As características dos clones utilizados no cultivo da mandioca variam de acordo com a aptidão comercial da cultura, ou seja, para o processo industrial e consumo humano "in natura". O presente trabalho objetivou identificar clones novos de mandioca obtidos por policruzamento na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em 1998 com relação a essas aptidões. Para tanto, procurou-se identificar clones com padrões moleculares semelhantes aos padrões apresentados pelos clones comerciais. A metodologia utilizada para a extração do DNA e obtenção dos padrões de bandas foi a mesma recomendada para a técnica de marcador molecular microsatélite. A caracterização molecular dos clones de mandiocas do acesso UFLA e clones comerciais apresentaram uma distribuição de similaridade concentrada em dois grupos. Um grupo é composto pelos clones comerciais de consumo humano "in natura" Baiana, Casca-roxa e IAC 576-70, e os acessos UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 e UFLA 55. Outro grupo é composto pelos clones comerciais para processo industrial, FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e IAC 15, e os acessos UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 e UFLA 64. A cultivar comercial Ouro-do-vale e os clones UFLA 38 e UFLA 69 sequer enquadraram-se em qualquer grupo, seja de mesa ou indústria, enquanto, que o clone Pão-da-china (de mesa) agrupou-se junto com os clones da indústria. Portanto, a utilização dos primers foi adequada para agrupar os clones com aptidão para uso "in natura", mas não para indústria.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*. Agrupamento. Microsatélite. Clones novos.

ABSTRACT

The characteristics of the clones used in the cassava cultivation vary in according to the commercial aptitude of the culture, for industrial processing or “in nature” human consumption. The present research aimed to identify new cassava clones obtained by polycross in the Federal University of Lavras (UFLA) in 1998 regarding those aptitudes. For such, an attempt was made to identify clones with molecular patterns similar to the patterns presented by the commercial clones. The methodology used for the DNA extraction and the obtaining the band patterns was the same recommended for the of Microsatellite molecular marker technique. The molecular characterization of the cassava clones of the UFLA accession and commercial clones already established presented a distribution similarity concentrated in two large groups. One group is composed by commercial “in nature” human consumption clones Baiana, Casca-roxa and IAC 576-70, and the UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 and UFLA 55 accesses. The other group is composed by commercial industrial processing clones, FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e IAC 15, and the UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 and UFLA 64 accesses. The commercial cultivar Ouro-do-vale and the clones UFLA 38 and UFLA 69 not framed in any group, either “in nature” human consumption or industrial processing, while the clone Pão-da-china (“in nature” human consumption) was grouped together with clones for the industrial processing. So, the use of primers was appropriate to group the clones for the “in nature” human consumption, but not for industry.

Keywords: *Manihot esculenta*. Grouping. Microsatellite. New clones.

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta elevada variabilidade genética e é cultivada em todas as regiões brasileiras, para os fins mais diversos, sendo considerada uma importante cultura de subsistência para muitas comunidades (FERREIRA et al., 2008; MKUMBIRA et al., 2003; TAKAHASHI; GONÇALO, 2005; VIEIRA et al., 2008).

Popularmente, suas variedades são classificadas em dois grupos: a) mandioca para mesa, conhecida também como aipim, macaxeira, mandioca mansa e mandioca doce; b) para indústria, também conhecida por mandioca brava (VALLE et al., 2004; VIEIRA et al., 2009). Essa classificação está relacionada à capacidade de liberação de ácido cianídrico (HCN), substância altamente tóxica se ingerida. A mandioca brava tem sabor amargo e as mansas são levemente adocicadas (MEZZETE et al., 2009). O sabor amargo está associado ao potencial cianogênico da planta. Apesar de não haver caracteres morfológicos especificamente associados à distinção entre mandioca brava e mandioca de mesa, conjuntos de marcadores de DNA ou morfológicos, podem estabelecer uma distinção entre estes dois grupos (MÜHLEN et al., 2000).

No Brasil, diferentes variedades de mandioca são conservadas em bancos de germoplasmas (VIEIRA et al., 2007) ou em coleções de acesso, distribuídos em todo o país. Apesar da reconhecida variabilidade genética existente nesses locais, o germoplasma da mandioca ainda tem sido pouco estudado sob o ponto de vista genético. A escassez de informações, principalmente aquelas relacionadas à documentação e caracterização genética, e a carência de estudos sobre o conhecimento da diversidade genética das espécies com potencial econômico, fazem com que a conservação e caracterização de germoplasma se torne necessária para assegurar informações sobre essas fontes de genes para utilização futura (COSTA et al., 2003). Nesse contexto, os

marcadores de DNA representam técnicas importantes nos estudos de evolução, domesticação, mapeamento genético e clonagem.

Vários estudos com marcadores moleculares têm sido realizados no Brasil e em outros países, com RADP (CARVALHO; SCHAAL, 2001; COLOMBO et al., 1998; COSTA et al., 2003; MÜHLEN et al., 2000; ZACARIAS et al., 2004), com AFLP (MÜHLEN et al., 2000) e com microssatélites (CARVALHO; SCHAAL, 2001; MKUMBIRA et al., 1998; MÜHLEN et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2009). Verifica-se que além da capacidade de gerar altos níveis de polimorfismo, os microssatélites apresentam: alta reprodutibilidade, simplicidade e rapidez da técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de utilização e grande poder de resolução (OLIVEIRA et al., 2006), e ainda apresentam variabilidade de locos bastante superior à detectada pelos marcadores RAPD ou AFLP (MÜHLEN et al., 2000).

O objetivo do trabalho foi detectar, em dez clones de mandioca obtidos por policruzamento no ano de 1998 na Universidade Federal de Lavras, a semelhança molecular com cultivares de mesa e indústria já consagradas no mercado, por meio de marcadores microssatélites.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Avaliou-se, por meio do uso de marcadores microssatélites, o comportamento molecular em dez clones de mandioca da coleção de variedades da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em comparação com dez cultivares comerciais, sendo cinco de mesa e cinco de indústria. Os nomes e aptidão dos clones encontram-se na Tabela 1. Os clones novos foram obtidos em campo de policruzamento, como parte do programa de melhoramento da mandioca conduzido na UFLA. Foram utilizados no policruzamento, clones oriundos do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas - BA.

Tabela 1 Clones obtidos na UFLA e cultivares comerciais utilizadas na determinação de similaridade genética em Lavras

Identificação	Nome	Aptidão
Clones comerciais		
C1	Baiana	Mesa
C2	Casca-roxa	Mesa
C3	IAC 576/70	Mesa
C4	Pão-da-china	Mesa
C5	Ouro-do-vale	Mesa
C6	Fibra	Indústria
C7	IAC 15	Indústria
C8	IAC 13	Indústria
C9	IAC 14	Indústria
C10	IAC 12	Indústria
Clones novos		
C11	UFLA 7	(1)
C12	UFLA 38	(1)
C13	UFLA 64	(1)
C14	UFLA 36	(1)
C15	UFLA 20	(1)
C16	UFLA E	(1)
C17	UFLA 69	(1)

“Tabela 1, continua”

“Tabela 1, conclusão”

C18	UFLA 22	(1)
C19	UFLA 33	(1)
C20	UFLA 55	(1)

(1): destinação ainda não estabelecida.

A metodologia utilizada para extração de DNA foi a descrita por Dellaporta et al. (1983), com modificações de Mühlen (1999) e para a obtenção de bandas de microssatélites utilizou-se as metodologias de Chavarriga-Aguirre et al. (1998) e Roa et al. (2000) com modificações de Mühlen (1999).

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Análise de Sementes da UFLA. Coletaram-se, pelo período da manhã, folhas do terço superior das variedades de mandioca. As folhas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e armazenadas em recipientes plásticos em Freezer (- 82°C).

Para a extração foram pesados 100mg do material macerado e adicionado 800µl de tampão de extração CTAB 2% com a seguinte composição: 46ml de H₂O, 20ml de Tris HCl 1M pH 7,5, 28ml de NaCl 5M, 4ml de EDTA 0,5M pH 8,0, 2g CTAB e 2ml de β mercaptoetanol. As amostras foram colocadas em banho maria a 65 °C por 60 min e homogeneizadas a cada 10 min. Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente por aproximadamente 5 min, foram adicionados 800µl de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 e homogeneizados levemente durante 5 min para obtenção de uma emulsão, que posteriormente, foi centrifugada a 14000 rpm durante 10 min.

O sobrenadante foi transferido para outro micro-tubo e novamente foi adicionado 800µl de clorofórmio-álcool isoamílico repetindo-se as mesmas condições até a centrifugação a 14000 rpm.

O sobrenadante foi retirado, sendo adicionado isopropanol gelado na proporção de 1:1 para a precipitação dos ácidos nucleicos. Os micro-tubos ficaram incubados a 4 °C durante 2 horas e posteriormente foram centrifugadas a

14000 rpm/10 min. O precipitado foi secado por cerca de 20 minutos e então foram adicionados 50µl de TE + 2µl RNase (10mg/ml), mantendo a temperatura de 37 °C durante 1 hora.

Após esse período, o DNA foi precipitado com 100µl de etanol 95% e lavado com o etanol 70%. Após a eliminação do álcool etílico 70%, o precipitado foi secado e, posteriormente, diluído com 5µl de TE e o DNA quantificado em fluorímetro Hoeffler Scientific TKO100.

2.1 Marcadores SSRs

Para amplificação de microssatélites foi seguida a metodologia descrita por Chavarriga-Aguirre et al. (1998) e modificada por Mühlen (1999). Os pares de iniciadores foram desenvolvidos especialmente para mandioca (ver seqüências em CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 1998). Foram marcados com fluorescência (por Research Genetics ou Perkin-Elmer) e analisados em equipamento ABI-Prism 377 e com os programas GeneScan e Genotyper.

Foram adquiridos 13 primers da MWG BIOTECH AG. Para as reações de PCR foram retirados 3µl de DNA na concentração de 10ng e acrescentados 4,8µl água ultra pura, 0,3µl de cada primer; 0,5µl de dNTP, 1µl tampão 10X e 0,1 µl da enzima Taq polimerase, em um volume total de 10µl (Tabela 2). As amplificações foram realizadas no termociclador NJ RESEACH modelo PTC 200, em sete ciclos diferentes:

1. 94 °C - 2 min.
2. 94 °C - 20 seg.
3. 56 °C - 20 seg.
4. 72 °C - 20 seg.
5. 94 °C - 19 ciclos.
6. 69 °C - 30 min.

7.4 °C.

Tabela 2 Sequências dos primers (forward/reverse) usados em análises SSR

Primer	Seqüência dos primers 5' para 3'
1	F: TAA TGT CAT CGT CGG CTT CG R: GCT GAT AGC ACA GAA CAC AG
2	F: GAT TCC TCT AGC AGT TAA GC R: CGA TGA TGC TCT TCG GAG GG
3	F: TTC CCT CGC TAG AAC TTG TC R: CTA TTT GAC CGT CTT CGC CG
4	F: GTA CAT CAC CAC CAA CGG GC R: AGA GCG GTG GGG CGA AGA GC
5	F: GGC TTC ATC ATG GAA AAA CC R: CAA TGC TTT ACG GAA GAG CC
6	F: AGC AGA GCA TTT ACA GCA AGG R: TGT GGA GTT AAA GGT GTG AAT G
7	F: CAA TGC AGG TGA AGT GAA TAC C R: AGG GTG CTC TTC AGA GAA AGG
8	F: AGT GGA AAT AAG CCA TGT GAT G R: CCC ATA ATT GAT GCC AGG TT
9	F: CTC TAG CTA TGG ATT AGA TCT R: GAT GCT TCG AGT CGT GGG AGA
10	F: ACA ATG TCC CAA TTG GAG GA R: ACC ATG GAT AGA GCT CAC CG
11	F: CGT TGA TAA AGT GGA AAG AGC A R: ACT CCA CTC CCG ATG CTC GC
12	F: TTC AAG GAA GCC TTC AGC TC R: GAG CCA CAT CTA CTC GAC ACC
13	F: TGT TCT TGA TCT TCT GCT GCA R: TGA TTG TGG ACG TGG GTA GA

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida por eletroforese a 100V por 2 horas. Para aplicação no gel, foi acrescentado ao DNA amplificado 3µl de corante DAE e alíquotas de 13µl do material foram aplicados.

Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas foram separadas e o gel foi imerso em 1

litro de solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,5% e água destilada) e mantido sob agitação lenta por 15 minutos. Em seguida o gel foi submerso em 1 litro de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) sob agitação lenta por 15 minutos. O gel foi lavado com água destilada e posteriormente colocado em 1 litro de solução de NaOH 3%, formaldeído 0,5% e água destilada sob agitação lenta até a completa visualização das bandas.

3 ANÁLISE DOS DADOS

Os fragmentos de DNA amplificados foram computados como presença ou ausência de bandas, e montada uma matriz com 1 representando presença e 0 representando ausência. Foram analisadas todas as bandas, tanto polimórficas como monomórficas. Foi estimada a similaridade genética (S) entre os clones de mandiocas do acesso UFLA e clones comerciais com base no índice de Jaccard, conforme Alfenas et al. (1991). Os cálculos foram feitos usando o programa NTSYS-PC 2.1 (ROHLF, 1992), foi gerado o dendrograma pelo método UPGMA.JACCARD.

As análises discriminantes, baseadas no método não paramétrico de k vizinhos mais próximos, foram aplicadas segundo Cruz e Carneiro (2006) utilizando o aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006). No método k vizinhos mais próximos, o valor de k é definido a *priori* de maneira arbitrária. Nesse trabalho foi pré-estabelecido um valor k=3, no caso de ocorrência de empate entre probabilidades, a observação foi alocada numa população designada de ‘desconhecida’.

A classificação a *priori* dos clones em estudo foi realizada de acordo com a caracterização molecular (mesa e indústria), ficando assim estabelecida:

- a) Consumo humano “in natura” (mesa) – 7 clones;
- b) Processo industrial – 10 clones.

Os três clones restantes foram alocados a *posteriori*, por não atenderem aos critérios de inclusão nas populações pré-definidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se no dendrograma gerado com base nas similaridades de Jaccard valores de similaridade variando de 0,15 a 0,75 (Figura 1), esses resultados indicam elevada variabilidade genética entre os materiais em estudo. Siqueira et al. (2009), estimando a diversidade genética entre 42 acessos de mandioca, provenientes de cinco regiões brasileiras, por meio de microssatélites, também constataram alta variabilidade genética (valores de similaridade entre 0,19 a 0,83), ocorrendo formação de cinco grupos, conforme, os autores à alta variabilidade genética foi devido à polinização cruzada e a propagação vegetativa da cultura. No presente estudo a elevada variabilidade genética é justificada pela utilização de clones com diferentes aptidões comerciais (mesa e indústria).

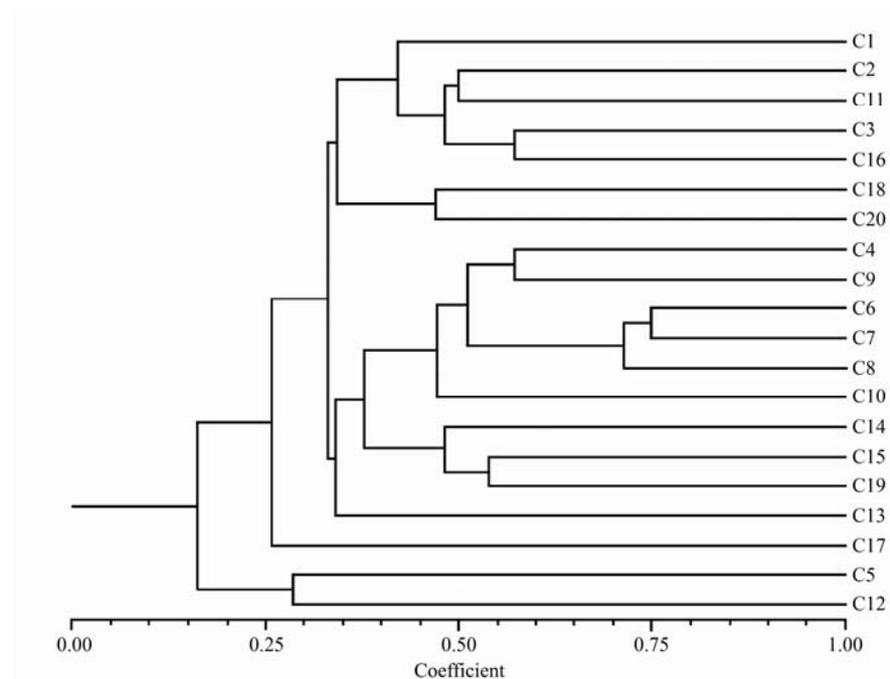


Figura 1 Dendrograma dos acessos de mandioca estudados, com base no índice de similaridade de Jaccard

Mühlen et al. (2000), estimando a diversidade genética de etnovarietades de mandioca, através de microssatélites, verificaram que esses marcadores detectaram uma possível compartimentalização do germoplasma de mandioca em dois grupos: variedades de indústria e variedades de mesa. Apresentando uma média de similaridade de 0,59, variando de 0,24 a 1,00. Mkumbira et al. (1998), utilizando microssatélite, também conseguiram uma boa separação entre genótipos de mandiocas bravas de mansas.

No presente estudo a caracterização molecular dos clones de mandiocas do acesso UFLA e clones comerciais já consagrados apresentou uma distribuição de similaridade concentrada em dois grupos. Um grupo é composto pelos clones comerciais de mesa Baiana, Casca-roxa e IAC 576-70, e os acessos

UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 e UFLA 55. O outro grupo é composto pelos clones comerciais para indústria, FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e IAC 15, e os acessos UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 e UFLA 64. Verifica-se que a cultivar comercial Ouro-do-vale e os clones UFLA 38 e UFLA 69 sequer enquadraram-se em qualquer grupo, seja de mesa ou indústria, enquanto, que o clone Pão-da-china (de mesa) agrupou-se junto com os clones da indústria. Portanto, a utilização de todos os primers utilizados não foi adequada para agrupar os clones com aptidão para indústria, o que não ocorreu com os clones para mesa. Somente após a identificação dos primers que realmente possibilitam a discriminação dos dois grupos (mesa e indústria) os clones novos devem ser analisados e alocados em seus grupos característicos.

Com base no dendrograma pode-se verificar que os clones UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 e UFLA 55 possuem caracterização molecular para a utilização como mesa, devido seu agrupamento com as variedades comerciais tradicionalmente usadas para essa finalidade. Os demais clones UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 e UFLA 64, no entanto, possuem caracterização molecular para indústria por pertencerem ao mesmo grupo das cultivares FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e IAC 15 de aptidão para a indústria.

Observa-se que a variedade Pão-da-China, de aptidão mesa, apresentou-se associada às cultivares comerciais de aptidão para indústria. Esse comportamento não era esperado, em relação ao teor cianogênico da mandioca. Contudo, a variedade assemelha-se às cultivares comerciais para mesa, em relação a outros caracteres (VALLE et al., 2004).

Conforme Alves et al. (2009), os marcadores moleculares constituem opções promissoras para interligar fontes de recursos genéticos e programas de melhoramento das espécies cultivadas. Assim, resultados obtidos com caracterização molecular poderão ser utilizados em programas de melhoramento, visando o lançamento de novas cultivares.

Os resultados das análises discriminantes, baseadas em k vizinhos mais próximos são apresentados na Tabela 3. A discriminação dos clones em estudo segundo a caracterização molecular (mesa e indústria) evidencia que os clones dos grupos para consumo humano “in natura” (mesa) e processo industrial foram eficientemente alocados em seus grupos de origem. A taxa de erro aparente foi de 5,88 % com apenas uma classificação incorreta. Embora relativamente baixo este valor é resultante, da pouca eficiência dos primers em agrupar os clones para indústria.

Dos clones classificados *a posteriori*, dois, o acesso UFLA 38 e a cultivar comercial Ouro-do-vale, foram alocados no grupo para consumo humano “in natura” (mesa) e o acesso UFLA 69 no grupo para indústria.

Tabela 3 Análise discriminante de clones de mandioca para mesa e indústria, baseada em k vizinhos mais próximos (k=3). Os valores destacados em negrito referem-se aos percentuais de alocação dos clones nos seus respectivos grupos de origem

Grupo de origem	Nº de acessos	Percentuais de alocação nos diferentes grupos	
		Mesa	Indústria
Mesa	7	100,00	0,00
Indústria	10	10,00	90,00
Clones alocados a <i>posteriori</i>	3	66,66	33,33
Total de clones alocados	20	9	11

5 CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites foram eficientes para identificar os novos clones de mandioca apropriados ao uso "in natura", mas não para o processo industrial.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242 p.

ALVES, M. F. et al. Marcadores moleculares polimórficos entre algodoeiros mocós e herbáceos. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 406-411, set. 2009.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHALL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, n. 1, p. 133-142, June 2001.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. et al. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 3, p. 493-501, Aug. 1998.

COLOMBO, C. et al. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 105-113, mar. 1998.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 158-164, jan. 2003.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: estatística experimental e biometria**. Viçosa, MG. UFV: 2006. 285 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. rev. Viçosa, MG: UFV, 2006. v. 2, 585 p.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. R. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

FERREIRA, C. F. et al. Molecular characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 23-29, mar. 2008.

MEZZETE, T. F. et al. Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agrônômicas, tecnológicas e químicas. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 601-605, set. 2009.

MKUMBIRA, J. et al. Classification of cassava into 'bitter' and 'cool' in Malawi: From farmers' perception to characterization by molecular markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 132, n. 1, p. 7-12, 2003.

MKUMBIRA, J.; MAHUNGU, N. M.; SALIPIRA, K. L. Distribution of hydrogen cyanide in cassava germplasm in Malawi. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 17, p. 75, 1998. Suplemento.

MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculente* Crantz)**. 1999. 176 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1999.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 319-328, abr./jun. 2000.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, jun. 2006.

ROA, A. C. et al. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 11, p. 1647-1655, Nov. 2000.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Applied Biostatistics, 1992. 237 p.

SIQUEIRA, M. V. B. M. et al. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 1, p. 104-110, mar. 2009.

TAKAHASHI, M.; GONÇALO, S. **A cultura da mandioca**. Paranavaí: Olímpica, 2005. 116 p.

VALLE, T. L. et al. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 221-226, maio/ago. 2004.

VIEIRA, E. A. et al. Comportamento de genótipos de mandioca de mesa no Distrito Federal. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p. 113-122, mar. 2009.

VIEIRA, E. A. et al. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1707-1715, dez. 2008a.

VIEIRA, E. A. et al. **Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do cerrado acessada por meio de descritores morfológicas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 15 p.

ZACARIAS, A. M. et al. Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculente* Crantz) GERMOPLASM FORM Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica**, Wageningen, v. 138, n. 1, p. 49-53, July 2004.

CAPITULO 3

VARIABILIDADE GENÉTICA DE CLONES DE MANDIOCA, ACESSADA POR MARCADORES DE MICROSSATÉLITES

RESUMO

A disponibilidade de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) adaptadas à Região Sul do Estado de Minas Gerais com boa produtividade de raízes, pode despertar a atenção dos agricultores para essa cultura, tanto para o consumo humano e animal, como para utilização na indústria. O uso de marcadores moleculares de DNA, visando a caracterização de clones de mandioca é bastante promissor para caracterização de clones de mandioca destinados aos plantios comerciais. No presente trabalho, por meio do uso de marcadores moleculares do tipo Microssatélites, usando 13 primers para amplificação, foi possível caracterizar 100 clones de mandioca, sendo 77 obtidos por policrozamento no ano de 1998 na Universidade Federal de Lavras e 23 cultivares já em uso pelos produtores rurais. A obtenção do material genético para a extração do DNA foi feita a partir de folhas de clones de mandioca da coleção de acessos da UFLA. Os resultados indicam que o primer 13 apresentou maior amplificação de alelos. Já os primers 7 e 11 não amplificaram alelos para nenhum dos clones e bandas. Os dendrogramas gerados com bases nos alelos amplificados demonstram a existência de grupos de clones geneticamente similares e algumas inferências são feitas com base nessa identificação.

Palavras- chave: *Manihot esculenta*. Cultivares. Similaridade genética.

ABSTRACT

The availability of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) adapted to the South region of the state of Minas Gerais with a good root yield can raise attention of the farmers to this crop, both for human and animal consumption and for utilization in the industry. Use of molecular DNA markers, aiming at the characterization of cassava clones is quite promising for the characterization of cassava clones intended for commercial plantings. In the present work by means of the use of molecular markers of the type Microsatellites, using 13 primers for amplification, it was possible to characterize 100 cassava clones, namely, 77 obtained by polycrossing in the year of 1998 in the Federal University of Lavras and 23 cultivars already in use by farmers. The obtaining of the genetic material fro DNA extraction was done from leaves of cassava clones of the UFLA collection of accessions. The results point out that primer 13 presented higher amplification of alleles. However, primers 7 and 11 did not amplify alleles for none of the clones and bands. The dendrograms generated on the basis on the amplified alleles demonstrated the existence of groups of genetically similar clones and some inferences are done on the basis of the identification.

Keywords: *Manihot esculenta*. Cultivars. Genetic similarity.

1 INTRODUÇÃO

A mandioca, espécie originalmente sul-americana, apresenta elevada diversidade genética em decorrência da facilidade de polinização cruzada, alta heterozigose e deiscência abrupta dos seus frutos. Tal característica possibilita que a mandioca seja amplamente cultivada no Brasil e no mundo para os mais diferentes fins (CARVALHO; SCHAAL, 2001; FERREIRA et al., 2008), estendendo desde a alimentação básica à uma série de produtos industriais (TAKAHASHI; GONÇALO, 2005).

Em Minas Gerais, o cultivo da mandioca vem despertando a atenção dos agricultores, tanto para o consumo humano e animal quanto para a utilização na indústria. Nesse contexto, programas de melhoramento genético tornam-se imprescindíveis para atender à essa crescente demanda regional.

No Brasil, a variabilidade genética de mandioca é conservada em bancos de germoplasma ou em coleções de acesso, distribuídos em todo o país. Contudo, para a utilização eficiente desses recursos, é importantíssima a caracterização dessa diversidade genética através de estudos de efeitos diretos e indiretos das características agronômicas nos programas de melhoramento voltados à cultura (GOMES et al., 2007).

Entre as técnicas utilizadas para a estimativa da divergência genética, destacam-se os marcadores moleculares e as de caracteres fenotípicos (VIEIRA et al., 2007). Os marcadores moleculares permitem a avaliação, em curto prazo, de um número elevado de genótipos, além de não sofrerem influência ambiental, como ocorre com marcadores morfológicos (COSTA et al., 2003). Portanto, eles têm sido utilizados freqüentemente na estimativa da diversidade genética entre acessos de mandioca (COSTA et al., 2003; MUHLEN et al., 2000; VIEIRA et al., 2008b). Entre os marcadores moleculares de DNA existentes, os

microsatélites apresentam maior sensibilidade à variabilidade de locos do que os detectados por RAPD ou AFLP (MÜHLEN et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi identificar a variabilidade genética de 100 clones de mandioca existentes na coleção de acessos UFLA, através de microsatélites.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Usando-se marcadores microsatélites, 100 clones de mandioca da coleção de acessos da UFLA (Tabela 1) foram caracterizados molecularmente. Desses, 77 são novos clones, obtidos por policruzamento em 1998 na UFLA, e 23 são cultivares de uso já há vários anos. Dessas 23 cultivares sete não possuem denominação específica, sendo aqui designadas como “Desconhecida1”, “Desconhecida2”, “Desconhecida3”, “Desconhecida4”, “Desconhecida5”, “Desconhecida6” e “Desconhecida7”.

Tabela 1 Clones obtidos na UFLA e cultivares comerciais utilizadas na determinação de similaridade genética em Lavras, MG, 2009. Clones obtained at the UFLA and commercial cultivars utilized in determining genetic similarity in Lavras, MG, 2009

Identificação	Origem	Nome
V1	LAVRAS/MG/BRASIL	BAIANA
V2	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA7
V3	LAVRAS/MG/BRASIL	CASCA ROXA
V4	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLAH
V5	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA30
V6	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA4
V7	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA48
V8	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA42
V9	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA90
V10	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA2
V11	IAC/CAMPINAS/SP/BRASIL	IAC576/60
V12	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA63
V13	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA33
V14	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA59
V15	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLAG
V16	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA25
V17	LAVRAS/MG/BRASIL	DESCONHECIDA7
V18	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA9
V19	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA19
V20	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA41

“Tabela 1, continua”

“Tabela 1, conclusão”

V21	LAVRAS/MG/BRASIL	DESCONHECIDA2
V22	IAC/CAMPINAS/SP/BRASIL	FIBRA
V23	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLAE
V24	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA47
V25	LAVRAS/MG/BRASIL	DESCONHECIDA4
V26	LAVRAS/MG/BRASIL	DESCONHECIDA6
V27	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA16
V28	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA39
V29	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA52
V30	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA40
V31	IAC/CAMPINAS/SP/BRASIL	IAC15
V32	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA5
V33	IAC/CAMPINAS/SP/BRASIL	IAC13
V34	LAVRAS/MG/BRASIL	SEIS MESES
V35	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA76
V36	LAVRAS/MG/BRASIL	DESCONHECIDA5
V37	IAC/CAMPINAS/SP/BRASIL	MOCOTÓ
V39	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA11
V40	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA65
V41	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA18
V42	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA61
V43	IAC/CAMPINAS/SP/BRASIL	IAC12
V44	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA23
V45	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA8
V46	LAVRAS/MG/BRASIL	JB
V47	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA64
V48	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA13
V49	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA51
V50	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA60
V51	IAC/CAMPINAS/SP/BRASIL	IAC14
V52	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA74
V53	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA44
V54	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA66
V55	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA21
V56	LAVRAS/MG/BRASIL	PINHEIRA
V57	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA75
V58	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA17
V59	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA27
V60	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA24
V61	LAVRAS/MG/BRASIL	BAIANINHA

“Tabela 1, continua”

“Tabela 1, conclusão”

V62	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA15
V63	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLAJ
V64	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA45
V65	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA31
V66	LAVRAS/MG/BRASIL	AMARELINHA
V67	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA49
V68	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA12
V69	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA58
V70	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA13
V71	LAVRAS/MG/BRASIL	PÃO-DA-CHINA1
V72	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA71
V73	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA36
V74	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA69
V75	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA53
V76	PATOS D MINAS/MG/BRASIL	MANABOIU
V77	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA28
V78	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA77
V80	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA10
V81	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA55
V82	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA46
V83	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA60
V84	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA68
V85	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA26
V86	LAVRAS/MG/BRASIL	PÃO-DA-CHINA2
V87	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA32
V88	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA20
V89	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA72
V90	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA29
V91	IAC/CAMPINAS/SP/BRASIL	OURO DO VALE
V92	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA62
V93	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA67
V94	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA56
V95	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA1
V96	LAVRAS/MG/BRASIL	DESCONHECIDA1
V97	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA22
V98	LAVRAS/MG/BRASIL	DESCONHECIDA3
V99	UFLA/LAVRAS/MG/BRASIL	UFLA38
V100	LAVRAS/MG/BRASIL	BAIANA2

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Análise de Sementes da UFLA. Coletaram-se, pelo período da manhã, folhas do terço superior de plantas de cada acesso. As folhas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido. Em seguida foram acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas em freezer a -82°C .

Para a extração foram pesados 100mg do material macerado e adicionado 800 μl de tampão de extração CTAB 2% com a seguinte composição: 46ml de H_2O , 20ml de Tris HCl 1M pH 7,5, 28ml de NaCl 5M, 4ml de EDTA 0,5M pH 8,0, 2g CTAB e 2ml de β mercaptoetanol. As amostras foram colocadas em banho-maria a 65°C por 60 min e homogeneizadas a cada 10 min. Resfriaram-se amostras em temperatura ambiente por aproximadamente 5 min e, logo após, foram adicionados 800 μl de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 e homogeneizados levemente durante 5 min para obtenção de uma emulsão, que posteriormente, foi centrifugada a 14000 rpm durante 10 min.

Transferiu-se o sobrenadante para outro micro-tubo e adicionou-se 800 μl de clorofórmio-álcool isoamílico repetindo-se as condições até a centrifugação a 14000 rpm.

O sobrenadante foi retirado, sendo adicionado isopropanol gelado na proporção de 1:1 para a precipitação dos ácidos nucleicos. Os micro-tubos ficaram incubados a 4°C durante 2 horas e posteriormente foram centrifugadas a 14000 rpm/10 min. O precipitado foi secado por cerca de 20 minutos e então foram adicionados 50 μl de TE + 2 μl RNase (10mg/ml), mantendo a temperatura de 37°C durante 1 hora.

Por fim, o DNA foi precipitado com 100 μl de etanol 95% e lavado com o etanol 70%. Após a eliminação do álcool etílico 70%, o precipitado foi secado e, posteriormente, diluído com 5 μl de TE e o DNA quantificado em fluorímetro Hoeffler Scientific TKO100.

2.1 Marcadores SSRs

Foram usados 13 primers da MWG BIOTECH AG. Para as reações de PCR foram retirados 3µl de DNA na concentração de 10ng e acrescentados 4,8µl água ultra pura, 0,3µl de cada primer; 0,5µl de dNTP, 1µl tampão 10X e 0,1 µl da enzima Taq polimerase, em um volume total de 10µl. As amplificações foram realizadas no termociclador NJ RESEACH modelo PTC 200, em sete ciclos diferentes.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida por eletroforese a 100V por 2 horas. Para aplicação no gel, foi acrescentado ao DNA amplificado 3µl de corante DAE e alíquotas de 13µl do material foram aplicados. Com a mesma temperatura de anelamento para os 13 primers em estudo, avaliou-se em gel de poliacrilamida os 100 clones de mandioca.

Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas foram separadas e o gel foi imerso em 1 litro de solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,5% e água destilada) e mantido sob agitação lenta por 15 minutos. Em seguida o gel foi submerso em 1 litro de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) sob agitação lenta por 15 minutos. O gel foi lavado com água destilada e posteriormente colocado em 1 litro de solução de (NaOH 3%, formaldeído 0,5% e água destilada) sob agitação lenta até a completa visualização das bandas.

As bandas dos géis de PCR foram computadas como presença e ausência. Assim, foi montada uma matriz na qual a presença de banda foi representada por 1 e a ausência por 0. As similaridades entre os clones foram estimadas pelo método de Jaccard, conforme Afenas et al. (1991). Utilizando-se o programa NTSYS-PC 2.1 foi gerado o dendrograma pelo método UPGMA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Marcadores SSR gel de poliacrilamida

A seqüência dos primers 7 e 11 não amplificaram alelos para nenhum dos clones. O primer 13 foi o que apresentou maior polimorfismo.

3.2 Similaridade genética entre os clones

Os acessos de mandioca conservados no banco de germoplasma da UFLA apresentaram alta diversidade genética. Os coeficientes de similaridade de Jaccard variaram de 0 a 0,94. Pode-se observar a formação de grupos homogêneos quando a similaridade média dentro dos grupos foi de até 0,55 (Figura 1). O estabelecimento de agrupamento com homogeneidade dentro dos grupos genéticos pode ser o ponto inicial para uma avaliação mais minuciosa dos acessos estudados, visando à maior eficiência nos programas de melhoramento (VIEIRA et al., 2008a). Segundo esse mesmo autor, esse resultado possibilita ao pesquisador amostrar tipos pertencentes a grupos diferentes, que poderão ser avaliados quanto aos caracteres fenotípicos de interesse agrônômicos em ensaios mais elaborados, com delineamento experimental e realizados em diferentes locais visando à seleção de cultivares.

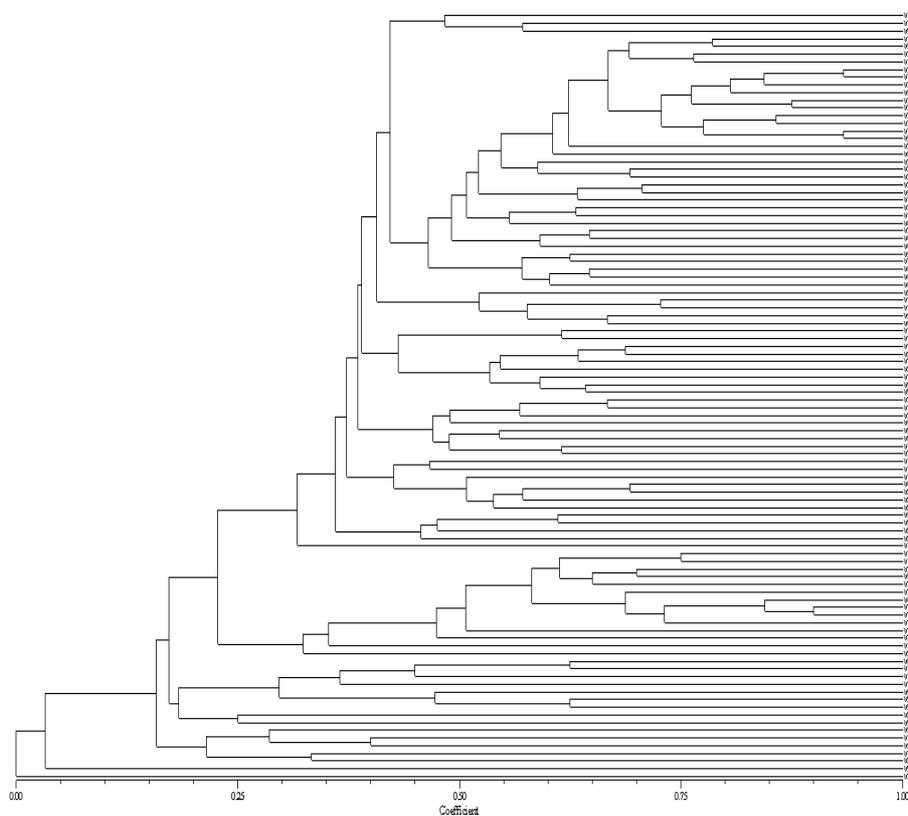


Figura 1 Dendrograma da similaridade genética entre os 100 clones de mandioca baseados em marcadores Microsatélites (SSRs). Dendrogram of genetic similarity among the 100 cassava clones based upon Microsatellite markers (SSRs)

O material denominado “Desconhecida 2” não apresentou similaridade com os demais acesso de mandioca. Tais características potencializam sua utilização em programas de melhoramento genético dentre os acessos do banco de germoplasma da UFLA. Por outro lado, as variedades “Fibra” e “UFLA18”, e as variedades “UFLA23” e “UFLA74”, apresentaram 94% de similaridade.

As cultivares “Manaboiu” e “Desconhecida 2” e os novos clones “UFLA26”, “UFLA38”, “UFLA30”, “UFLA63”, “UFLA21”, “UFLA48”,

”UFLA46”, “UFLA59” e ”UFLA29” não se agruparam com nenhum outro material. É pouco provável que haja relação entre essa diferença observada e a origem geográfica desses materiais, uma vez que, estudo semelhante, envolvendo 27 clones de diferentes localidades da Região Norte do Brasil, verificou grande divergência entre materiais oriundos da mesma localidade (COSTA et al., 2003).

A aptidão das variedades comerciais analisadas também é passível de inferência. Ao observar um baixo índice de similaridade (0,41) os materiais voltados para a indústria não se agrupam com materiais de mesa, a exemplo das cultivares “IAC 576/70” (mesa) e “Fibra” (indústria). Estudos descritivos com marcadores moleculares em acessos de mandioca em diferentes bancos de germoplasma, também têm evidenciado que materiais voltados para a indústria (mandioca brava) não se agrupam com materiais de mesa, a nível de DNA (MUHLEN et al., 2000; VIEIRA et al., 2008b).

4 CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites mostraram-se eficientes para determinar a divergência genética entre clones de mandioca da coleção de acesso da UFLA.

Determinadas seqüências dos primers Forward/Reverse apresentaram-se mais adequadas para a amplificação de alelos do que outras.

A aptidão comercial das variedades apresentou relação com a similaridade verificada.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242 p.
- CARVALHO, L. J. C. B.; SCHALL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, n. 1, p. 133-142, June 2001.
- COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 158-164, jan. 2003.
- FERREIRA, C. F. et al. Molecular characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 23-29, mar. 2008.
- GOMES, C. N. et al. Caracterização morfo-agronômica e coeficientes de trilha de caracteres componentes da produção em mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1121-1130, ago. 2007.
- MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 319-328, abr./jun. 2000.
- TAKAHASHI, M.; GONÇALO, S. **A cultura da mandioca**. Paranaíba: Olímpica, 2005. 116 p.
- VIEIRA, A. E. et al. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum*) as estimated by AFLP and morphological markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 392-399, Mar. 2007.

VIEIRA, E. A. et al. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1707-1715, dez. 2008a.

VIEIRA, E. A. et al. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 56-67, 2008b.