

(the original text in portuguese)

Biossistemática de espécies brasileiras do gênero *Manihot* baseada em padrões de proteína da semente

Por

Dario Grattapaglia e Nagib M. A. Nassar

Departamento de Engenharia Agronômica
Universidade de Brasília

José C. Dianese

Departamento de Biologia Vegetal
Universidade de Brasília

ABSTRACT

Biosystematic of wild cassava species (*Manihot* spp.) based on soluble seed protein patterns. Soluble seed protein of nineteen *Manihot* species were electrophoretically resolved by SDS-PAGE. The profiles revealed a banding pattern which varied in number, distribution and intensity of bands, reflecting the wide morphological and geographical range observed in the genus. The analysis showed *Manihot pilosa* to be the closest species to the cultigen. Electrophoretic evidences of introgression in the genus were obtained with *M. caerulescens*. A similarity matrix was set up in an attempt to quantify the affinity among species.

RESUMO

A eletroforese de proteína solúvel de semente de dezenove espécies do gênero *Manihot* Adans foi conduzida em gel de poliacrilamida com SDS. Os perfis obtidos revelaram-se heterogêneos quanto ao número, distribuição e intensidade das bandas, refletindo a variabilidade de morfologia e distribuição geográfica do gênero. Na análise realizada, *Manihot pilosa* mostrou ser a espécie mais próxima de *M. esculenta*. Indicações de introgressão no gênero foram constatadas em *M. caerulescens*. Propõe-se no trabalho um critério de quantificação da afinidade entre as espécies, expressa por meio de uma matriz de similaridade.

Com o interesse crescente em se relacionar a química das plantas a problemas sistemáticos, técnicas experimentais como cromatografia, serologia e eletroforese têm sido empregadas como medida do grau de relacionamento entre espécies. Proteínas do embrião de sementes maduras têm sido utilizadas em estudos desta natureza, por elas se entrarem em condição fisiológica estável. Em algumas culturas de importância econômica, tais como trigo¹, algodão², cevada³, soja⁴ e sorgo⁵, os resultados obtidos com os estudos dessas proteínas permitiram estabelecer inter-relações entre diferentes taxa.

Em trabalhos realizados com gêneros *Crotalaria*⁶, *Macrotyloma*, *Dolichos* e *Pseudovigna*⁷, *Cicer*⁸, *Phaseolus* e *Vigna*⁹, *Vigna*¹⁰, *Lens*¹¹, *Eragrostis*¹² e *Capsicum*¹³, a eletroforese de proteína de semente mostrou ser um instrumento útil nas investigações sistemáticas e filogenéticas, tendo em vista a correlação encontrada com estudos de citologia e compatibilidade genética.

No gênero *Manihot*, o qual inclui a mandioca cultivada, *M. esculenta* Crantz, esta técnica não foi antes utilizada. No presente trabalho procurou-se estabelecer o relacionamento entre algumas espécies do gênero *Manihot* incluindo a mandioca cultivada, visando ampliar o conhecimento atual sobre a filogenia das espécies nativas, e fornecer dados adicionais para programas de melhoramento que envolvam hibridações interespecíficas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo abrangeu 18 espécies silvestres, duas variedades de mandioca cultivada e duas coletas distintas de *M. caerulescens* Pohl (maniçoba do Nordeste), representando dez das treze seções que ocorrem no Brasil, segundo Rogers & Appan 14 (tabela 1).

Extração e preparo da proteína solúvel

Foram utilizadas sementes maduras coletadas no banco de germoplasma ativo da Universidade de Brasília mantido pelo segundo autor. Quebrando-se o tegumento, retirou-se em média 10 gramas do conteúdo de semente (embrião mais endosperma) para cada espécie, sendo necessário para tanto entre 30 e 100 sementes, dependendo do tamanho das mesmas. A fração de proteína solúvel foi obtida macerando-se em

almofariz o conteúdo das sementes junto ao dobro de seu peso em volume d'água destilada. O macerado foi em seguida centrifugado em rotor Sorvall GSA a 8000 g, 4°C durante 25 minutos. A fração solúvel obtida foi estocada a -20°C em alíquotas de 1 ml. A concentração protéica das frações foi estimada pelo método de Lowry et al.¹⁵, utilizando-se como padrão a albumina de soro bovino.

Eletroforese de proteína solúvel

A eletroforese em 0,1% SDS foi conduzida de acordo com Laemmli¹⁶. O gel concentrador contendo 5,5% de acrilamida em tampão TRIS-HCL pH = 6,8 foi preparado sobre o gel de análise com 16% de acrilamida em tampão TRIS-HCL pH = 8,35. O aparelho utilizado para a eletroforese foi do tipo vertical, conferindo ao gel dimensões totais de 15 cm x 13 cm x 0,7 mm. As frações de proteína solúvel foram suspensas em tampão de amostra de Laemmli16 a 100°C por cinco minutos. Cada reentrância no topo do gel recebeu 50 µg de proteína. A eletroforese foi iniciada com uma corrente constante de 5 mA. Quando o fronte atingiu o gel de análise a corrente foi aumentada para 12,5 mA e esta foi a corrente mantida até o final da eletroforese. O gel foi fixado durante doze horas em ácido tricloroacético 5%, as bandas coradas com Coomassia Brilliant Blue 0,65% em metanol-ácido acético-água destilada 5:1:5 v/v, seguindo-se o clareamento do gel com a mesma solução sem corante. Cada espécie teve seu perfil revelado em um mínimo de quatro géis diferentes. Os pesos moleculares aproximados (PMA) foram determinados de acordo com Weber e Osborn¹⁷, utilizando-se o padrão protéico de baixo peso molecular SDS-6 da Sigma.

Análise dos perfis eletroforéticos

Para proceder à análise dos perfis, foram selecionadas quinze bandas referência tendo em vista sua ocorrência e nitidez nos perfis das espécies. Avaliou-se o aspecto das quinze bandas selecionadas para referência em cada um dos quatro melhores perfis obtidos para cada espécie, enquadrando-as em 5 categorias de intensidade: A = banda referência ausente; B = banda pouco visível; C = banda visível; D = banda intensa; E = banda muito intensa.

Nos intervalos entre as bandas referência, contou-se o número de bandas visíveis, ou seja, o número de subunidades protéicas de menor densidade compreendidas nos intervalos (tabela 2).

Com a finalidade de se comparar quantitativamente os padrões protéicos, estabeleceram-se valores para as diferenças observadas na intensidade das mesmas bandas referência:

Comparação:	D x E	D x C	E x C	C x B	D x B	E x B	B,C,D,E x A
Valor:	1	1	2	1	2	3	5

Montando-se em seguida a Tabela 3.

Calculados os valores totais ($\sum V$) para cada comparação das intensidades das bandas referência, entre espécies, utilizou-se a seguinte expressão para o cálculo da Estimativa de Similaridade (ES):

$$ES \% = N^{\circ} br / N^{\circ} br + \sum V \times N^{\circ} br / N^{\circ} br + \Delta bi \times 100$$

Onde $N^{\circ} br$ = número de bandas referência, sempre igual a 15; $\sum V$ = valor total das comparações entre bandas referências; Δbi = diferença no número total de bandas intermediárias entre espécies.

Calculados os valores de ES para cada comparação montou-se uma matriz de similaridade agrupando-se as espécies por seção (tabela 4).

RESULTADOS

Os perfis de proteínas das espécies apresentados em fig. 43 (na [galeria dos fotos](#)) variaram principalmente no que se refere à intensidade das bandas. As quinze bandas referencia selecionadas estão esquematizadas, abrangendo toda amplitude de peso molecular dos perfis, de 81 a 13 daltons (k). Quatro bandas referência destacam-se pela maior freqüência com que aparecem nos perfis, apesar de haver variação nas suas intensidades, são elas: 66, 33, 30 e 21 K. Observa-se ainda que há uma maior concentração de subunidades polipeptídicas na faixa de peso molecular abaixo de 50 K. Nesta faixa dos perfis residem as diferenças principais no número e intensidade das bandas visíveis. Nas tabelas 2 e 3 estas diferenças são quantificadas. Em sete espécies verificou-se a ausência de uma das bandas referencia. As bandas ausentes sempre foram de baixos pesos moleculares.

Quanto ao número total de bandas visíveis, somou-se um máximo de 39 para *M. zehntneri* e um mínimo de 26 para *M. caerulea* ficando em 34 o número médio.

Na Tabela 3, a matriz de similaridade construída procura fornecer uma idéia global da afinidade entre as espécies. Valores máximos estimados através do nosso critério, encontram-se na faixa de 70 a 90%, a media girando em torno de 50% eos valores mais baixos sendo da ordem de 30%. Entre as espécies pertencentes à mesma seção. Os valores de similaridade calculados foram em geral altos, denotando a existência de um relacionamento mais estreito entre as mesmas.

DISCUSSÃO

As espécies estudadas apresentam uma grande variabilidade em morfologia

externa, hábito de crescimento e distribuição geográfica. Esta variação reflete-se nos perfis eletroforéticos com as diferenças observadas na intensidade e número de bandas visíveis. Estes foram os parâmetros utilizados nas estimativas de similaridade calculadas. O índice de similaridade usado em outros trabalhos semelhantes^{8, 11, 18} não se mostrou adequado ao tipo de perfil obtido, em vista do grande número de bandas visíveis e por não considerar a variação na intensidade das bandas.

A matriz de similaridade obtida com a análise apresenta uma correlação positiva com a taxonomia estabelecida para o gênero, fornecendo contudo novas informações de interesse.

Para as duas variedades de mandioca cultivada estimou-se 78% de similaridade. A maior estimativa de similaridade (ES) foi calculada entre duas coletas de maniçoba, ambas da espécie *M. caerulescens*, diferindo uma da outra no formato dos lobos foliares e tamanho da semente. Os perfis R e S mostram que apenas na banda 20 K ocorre uma diferença em intensidade; na tabela 4 observamos que a ES foi de 88%.

Altos valores de ES foram obtidos entre integrantes de outras seções. Na seção *Glaziovinae*, número III, as espécies estudadas, todas de hábito arbóreo, mostraram ser fisiologicamente bastante relacionadas com uma ES média de 67%, concordando com as características morfológicas e distribuição geográfica destas espécies, todas nativas em zonas áridas do nordeste brasileiro¹⁴.

Entre as duas espécies representantes da seção *Gracilesi*, número VI, obteve-se uma alta similaridade, da ordem de 78%. Tanto *M. fruticulosa* como *M. pentaphylla* ocorrem em zonas áridas do planalto central brasileiro¹⁴. Rogers & Appan¹⁴ concluem por uma análise taximétrica que estas duas espécies são as mais próximas dentro da seção. Seus perfis, N e O na Fig. 2, são bastante similares na distribuição de bandas, com as 33 K, 21 K e 20 K muito intensas, e com a presença de uma banda intermediária marcante imediatamente abaixo de 33 K. Na seção *Heterophyllae*, número II, constatam-se também valores relativamente altos de ES dentro da seção. O maior valor, 75%, foi estimado para *M. pilosa* e *M. corymbiflora*. A distribuição geográfica destas duas espécies coincide¹⁴ e a região de coleta do material utilizado também (tabela 1). A única diferença morfológica entre as duas reside no tamanho e número de flores estaminadas na inflorescência¹⁴, e, embora mantidas como taxa distintos, estas espécies são filogeneticamente muito afins.

Valores elevados de similaridade foram estimados entre algumas espécies silvestres e as duas variedades de mandioca. *M. pilosa* e *M. corymbiflora* parecem ser as espécies mais próximas da espécie cultivada. Rogers & Appan¹⁴ classificaram *M. pilosa* como sendo a espécie mais afim com *M. esculenta*. Além da seção *Heterophyllae*, a qual como um todo foi a que mais próxima se mostrou da mandioca, a seção *Glaziovinae* também apresenta valores de ES acima da média ao ser comparada com a seção *Manihot*. Esta constatação tem apoio na detecção de hibridação natural entre *M. esculenta* e *M. glaziovii*¹⁹ e a realização bem sucedida de hibridação controlada entre as duas espécies²⁰.

Uma evidência do processo de introgressão entre *M. esculenta* e espécies silvestres aparece ao analisarmos os valores de ES obtidos na seção *Caerulescentes*, número IX. Enquanto os perfis R e S apresentam uma baixa similaridade com a espécie cultivada, bem como com as demais espécies, a coleta proveniente de Jequié, perfil T, mostrou um perfil bem mais próximo dos demais, e, em relação a *M. esculenta* a presença de uma banda intermediária entre 20 e 18 K com o mesmo padrão. De fato, este material apresenta características distintas como a dormência muito reduzida de suas sementes, o formato da semente, a morfologia foliar e o seu crescimento em habitats alterados pelo homem²¹. Esta característica de planta invasora pode evidenciar a absorção de genes a partir da espécie cultivada seguindo o modelo proposto por Harlan & deWet²².

M. neusana, espécie recentemente descrita²³, não se encontra até o momento enquadrada em qualquer seção. Sua maior afinidade foi estimada com *M. pohlii* (ES = 78%). Estas espécies são morfológicamente muito semelhantes, como descrito o por Nassar²³. Este autor refere-se a *M. neusana* como sendo um isolado de *M. pohlii* o qual especiou-se devido a fatores de isolamento geográfico e acúmulo de mutações.

Em vista dos elevados valores de ES entre *M. neusana* e os representantes da seção *Heterophyllae*, sugerimos que esta nova espécie deve eventualmente enquadrar-se nesta seção.

M. reptans e *M. alutacea* apresentam valores de similaridade acima da média, quando comparados a representantes das seções *Heterophyllae* e *Glaziovinae*. Esta observação sugere a existência de uma maior facilidade de introgressão entre as quatro seções envolvidas. Híbridos naturais justamente entre *M. reptans* e *M. alutacea* já foram detectados²⁴. Segundo Nassar²⁴, a extensão da faixa ecotípica de *M. reptans* se deu em função de sua introgressão com germoplasma de outras espécies. De fato, vários tipos de *M. reptans* foram coletados em habitats diferentes²¹. Ao considerarmos as evidências eletroforéticas, *M. alutacea* pode apresentar características similares.

Observando a matriz de similaridade, verificou-se que para as demais comparações os valores de ES mostram um distanciamento filogenético mais acentuado entre as espécies consideradas. Os valores em média mais baixos são observados para *M. stipularis* e *M. caerulescens* subsp. *caerulescens* quando comparadas com as demais espécies (perfis P e R). Estas espécies representam de fato extremos morfológicos no gênero *Manihot*, sendo a primeira uma espécie subarborescente e a única acaulescente estudada, enquanto que a segunda possui um hábito arbóreo distinto atingindo alturas de até 10 metros. A variação *Manihot* spp., parece refletir a flexibilidade ecológica do gênero,

NOTAS E REFERÊNCIAS

1. B.L. Johnson, D. Barnhart e O. Hall – Analysis of genome and species relationships in polyploid wheats by protein eletrophoresis Amer. J. Bot., 54:1089-1092 (1967).
2. B.L. Johnson e M. M. Thein - Assessment of evolutionay affinities in Gossypium by protein electrophoreis. Amer. J., 57:1081-1092 (1970).
3. R.G. Mc Daniel - Electrophoretic characterization of proteins in Hordeum. J. Hered., 61:243-247 (1970).
4. D.W. Mites e T. Hymowitz - Comparative electrophoretic studies of trypsin inhibitors in seed of the genus Glycine. Bot. Gaz. 134:121-125 (1973).
5. Y. Schecher e J.M. de Wet - Comparativ electrophoresis and isoenzyme analysis of seed protein from races of Sorghum. Amer. J. Bot., 62:254-258 (1975).
6. D. Boulter, E. Derbyshire, J. ^a Frahn-Leliveld e R.M. Polhil - Observation of cytology and seed protein of various African species of Crotalattia (leguminosae). New Phytol., 69:117-131 (1970).
7. G.^a Dardene chimitaxonomie dans les genres Macrotyloma, Dolichos et Pseudovigna. Phytochemistry, 12:1983-1992 (1973).
8. G. Ladizinsky e A. Adler - The origin of chickpeaa as indicated by seed protein eletrophoresis. Isr. J. Bot., 24:183-189 (1975).
9. E. Derbyshire, J. N. Yarwood, E. Neat and D. Boulter - Seed proteins of Phaseolus and Vigna. New Phytol., 76:283-288 (1976).
10. J.F. Carasco, E. Derbyshire e D. Boulter - Seed protein profile of African representatives of Vigna spp. Taxon, 26(5/6):513-516 (1977).
11. G. Ladizinsky - Species relationships in the genus Lens as indicated by seed proteins eletrophoresis. Bot. Gaz., 140(4):449-451 (1979).
12. B. Endshaw e R. N. Lester - Biochemical assessment of the relationship of Eragrostis tef with some wild Eragrostis species. Ann. Bot. (Lond), 48(5):717-726 (1981).
13. J.M. Mcleod, S.I. Guttman, W.H. Eshabaugh e R.E. Rayle - An electrophoretic study of evolution in Capsicum (Solanaceae). Evol. 37(3):562-574 (1983).
14. D.J. Rogers e S. Appan - Manihot, Manihotoides. Flora Neotropica, Manograph n.13. Hafner Press, Nova York (1973).
15. O.H. Lowty, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr e R.L. Randall - Protein emassurement with the Floin reagent. J. Biol. Chem., 193:265-274 (1951).
16. U.K. Laemmli - Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685 (1970).
17. K. Webber e M.J. Osborn - The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl-Sulfate Polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244(16) :4406-4412 (1969).
18. P.J. Whitney, J.G. Vaughan, J.B. Heale - A disc electrophoresis study of proteins of Verticillium albo atrum, V. dahliae and Fusarium oxysporum with reference to their taxonomy. Ibid. 19:415-426 (1968).
19. N.M.A. Nassar - Geretic variation of wild Manihot species native to Brazil and its bearing on cassava improvment. Crop. Field Research 13(3) (no preto) (1986).
20. H.H. Storey and F.W. Nichols - Studies of the mosaic of cassava. Ann. Appl. Biol., 25(4):790-806 (1938).
21. N.M.A. Nassar - Collecting wild cassavas, Manihot spp. in Brazil. Turrialba, 32 (2):202-210 (1982).
22. J.R. Harlan e J.M. De Wet - The compilospecies concept. Evol., 17:497-501 (1963).
23. N.M.A. Nassar - Manihot neusana Nassar: uma nova espécie nativa do Paraná, Brasil. Ciencia e Cultura. 38(2):338-340 (1985).
24. N.M.A. Nassar - Natural hybrids hybrids between Manihot reptans Pax and M. Alutacea Rogers & Appan. Can. J. Plant. Sci., 64:423-425 (1984).

Tecnológico (CNPq), Brasília. A coleção viva em cima mencionada foi criada na UnB com apoio do Centro Internacional de Desenvolvimento Científico (IDRC), Ottawa, para quem o segundo autor é grato.

[Home](#) [Photo Gallery](#) [Articles](#) [Germplasm Announcements](#) [Excerpts](#) [News](#) [Biography](#) [Contact](#) [Links](#)