

FINGERPRINTING MOLECULAR NA ANÁLISE DE VARIEDADES, LINHAGENS MELHORADAS E GERMOPLASMA DE MAMOEIRO

Juliana Leles Costa¹, Eder Jorge de Oliveira², Lucas Ferraz dos Santos³ e Fabiana Moraes de Carvalho⁴

Resumo

O objetivo deste trabalho foi promover o *fingerprinting* de linhagens e variedades de mamoeiro com o uso de marcadores moleculares do tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Para isso, utilizou-se 32 genótipos, entre variedades, linhagens do programa de melhoramento e germoplasma pertencentes à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Foram amplificadas 383 bandas polimórficas, a partir das combinações de onze pares de iniciadores, com melhores resultados (maior polimorfismo) obtidos nas combinações dos iniciadores *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAA, *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAG e *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAT, com 40, 46 e 47 bandas polimórficas, respectivamente. A análise de agrupamento permitiu a formação de seis grupos. As principais variedades comerciais permaneceram no mesmo grupo, porém observou-se considerável diversidade genética dentro do agrupamento. Variabilidade adicional foi observada nas linhagens melhoradas.

Introdução

Os marcadores moleculares têm sido empregados extensivamente na caracterização da variabilidade genética em diversas culturas. Entretanto, existem poucos trabalhos na cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.), com o objetivo de identificar e manejar a variabilidade genética disponível para uso nos programas de melhoramento genético. Também, pouco se conhece sobre a divergência genética das atuais variedades de mamoeiro utilizadas comercialmente. Portanto, é preciso utilizar os marcadores como ferramentas adicionais neste tipo de avaliação.

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) são bastante utilizados para este fim, e se baseiam na amplificação seletiva, via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), de fragmentos de DNA genômico, gerados pela clivagem com enzimas de restrição (VOS et al., 1995), associando estratégias utilizadas pelas técnicas de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) e de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), com as vantagens de detectar múltiplos locos por reação, e apresentar alta repetibilidade.

O sucesso desta técnica deve-se, sobretudo, à rapidez na obtenção de grande volume de dados para a geração do *fingerprinting* molecular. O polimorfismo detectado pelo AFLP decorre principalmente da presença ou ausência do sítio de restrição para as enzimas de corte raro e frequente, conferindo a estas marcas um caráter dominante. Mesmo com esta limitação, o grande volume de bandas detectadas em um único gel o torna especialmente importante para este tipo de estudo.

Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de analisar a divergência genética entre variedades, linhagens melhoradas e germoplasma de mamoeiro pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mamoeiro (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), com intuito de conhecer a variabilidade genética presente no atual sistema de produção comercial e nos genótipos desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético do Mamoeiro do CNPMPF.

¹ Estudante de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, CEP 44380-000, E-mail: julianaleles_17@hotmail.com

² Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: eder@cnpmf.embrapa.br

³ Estudante de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: lufts@hotmail.com

⁴ Estudante de Biomedicina da Faculdade MARIA Milza, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: fabianamoraescarvalho@hotmail.com

Apoio financeiro: CNPq.

Material e Métodos

Foram utilizados 32 genótipos de mamoeiro para a caracterização molecular com marcadores AFLP (Tabela 1). O DNA dos genótipos foi extraído utilizando o protocolo com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações. A quantificação do DNA foi feita comparando as amostra com concentrações conhecidas de DNA do fago Lambda (Invitrogen).

Tabela 1. Genótipos utilizados na caracterização molecular com marcadores do tipo AFLP, com suas origens.

Genótipo	Tipo	Denominação	Origem
CMF008	Germoplasma	DCG593-10	Malasia
CMF012	Germoplasma	DCG595-6	Malasia
CMF018	Germoplasma	DCG424-6	Taiwan
CMF020	Germoplasma	DCG424-4	Brasil
CMF021	Variedade	Solsun	Brasil
CMF024	Variedade	Conchita	Costa Rica
CMF040	Germoplasma	JSII	Brasil
CMF041	Germoplasma	JS12	Brasil
CMF065	Germoplasma	K77xJSI2	Brasil
CMF074	Germoplasma	JS02	Brasil
CMF078	Variedade	Baixinho de S. Amália	Brasil
CMF087	Variedade	Waimanalo	Havaí
CMF088	Variedade	Kapoho purple	Havaí
CMF092	Variedade	Kapoho Green	Havaí
CMF123	Variedade	Vermelho Thai	Tailândia
CMF128	Variedade	Grampola – Taiwan	Taiwan
CMF154	Variedade	Maradol	Guatemala
CMF230	Germoplasma	Ouromel	Brasil
CMF232	Germoplasma	M5	Brasil
CMF233	Germoplasma	BS-Gondo	Brasil
CMF234	Germoplasma	BS-SF	Brasil
CMF235	Germoplasma	JTA	Brasil
–	Híbrido	Calimosa	Brasil
–	Variedade	Golden	Brasil
–	Variedade	Sunrise	Brasil
CMF-L30-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
CMF-L48-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
CMF-L75-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
CMF-L62-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
CMF-L12-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
CMF-L88-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
CMF-L90-08	Linhagem PMGM	–	Brasil

Para análise dos marcadores AFLP foi utilizado o protocolo descrito por Vos et al. (1995) com algumas modificações descritas por Oliveira et al. (2008). Brevemente, o DNA genômico (250 ng) foi digerido com a combinação de enzimas de corte raro (*EcoRI*) e freqüente (*MseI*). Os adaptadores foram ligados e o DNA foi pré-amplificado com o uso de uma base seletiva, conforme a combinação: E+A/M+C, onde E = adaptador *EcoRI*; M = adaptador *MseI*; A = adenina e C = citosina. Em seguida, o DNA foi amplificado utilizando os iniciadores com três bases seletivas para as enzimas de corte raro e corte freqüente [E+ACT/ M (M+CAA, M+CAC, CAT, CTA, CTC, CTG e CTT) e E+AAC/ M (M+CCA, CAC, CAG, CAT)], possibilitando 11 combinações. A visualização dos resultados foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e coloração com prata (CRESTE et al.,

2001). Foram anotadas apenas as bandas bem definidas, evitando as bandas que apresentam pequenas diferenças na posição do gel.

A matriz de distância genética foi obtida no SAS (Versão 9.1), utilizando o coeficiente de similaridade “Simple Matching”. O agrupamento foi realizado pelo programa Statistica (Versão 7.0). Para isso, foram avaliados os seguintes métodos: 1) ligação simples; 2) ligação completa; 3) método de Ward; e 4) UPGMA (*unweighted pair-method using an arithmetic average*), sendo que os ajustes entre a matriz de distâncias e dendograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r).

Resultados e Discussão

A análise de DNA com 11 combinações de iniciadores *EcoRI/MseI* permitiu a obtenção de 383 bandas polimórficos, com pesos variando de 100 a 1380 pares de bases (PB). As combinações de iniciadores produziram os seguintes números de bandas: E-ACT/M-CAA (27), E-ACT/M-CAC (32), E-ACT/M-CAT (20), E-ACT/M-CTA (30), E-ACT/M-CTC (26), E-ACT/M-CTG (37), E-ACT/M-CTT (39), E-AAC/M-CAA (40), E-AAC/M-CAC (39), E-AAC/M-CAG (46), E-AAC/M-CAT (47). Os dados deste trabalho mostram a capacidade do marcador AFLP em detectar alto nível de polimorfismo entre os acessos de mamoeiro, com uma média de 34,8 bandas por combinação de iniciador. A eficiência da técnica AFLP também pode ser confirmada em trabalhos realizados com outras culturas, como milho (MARSAN et al., 1998) e maracujazeiro-amarelo (GANGA et al., 2004). O método de agrupamento mais eficiente foi o UPGMA, com correlação cofenética de 0,74. Os métodos de ligação simples, ligação completa e de Ward, apresentaram correlações entre a matriz de distância e de agrupamento de 0,60, 0,62 e 0,57, respectivamente. Observou-se a formação de seis grupos, considerando o valor da distância genética média entre os genótipos de 0,20 (Figura 1).

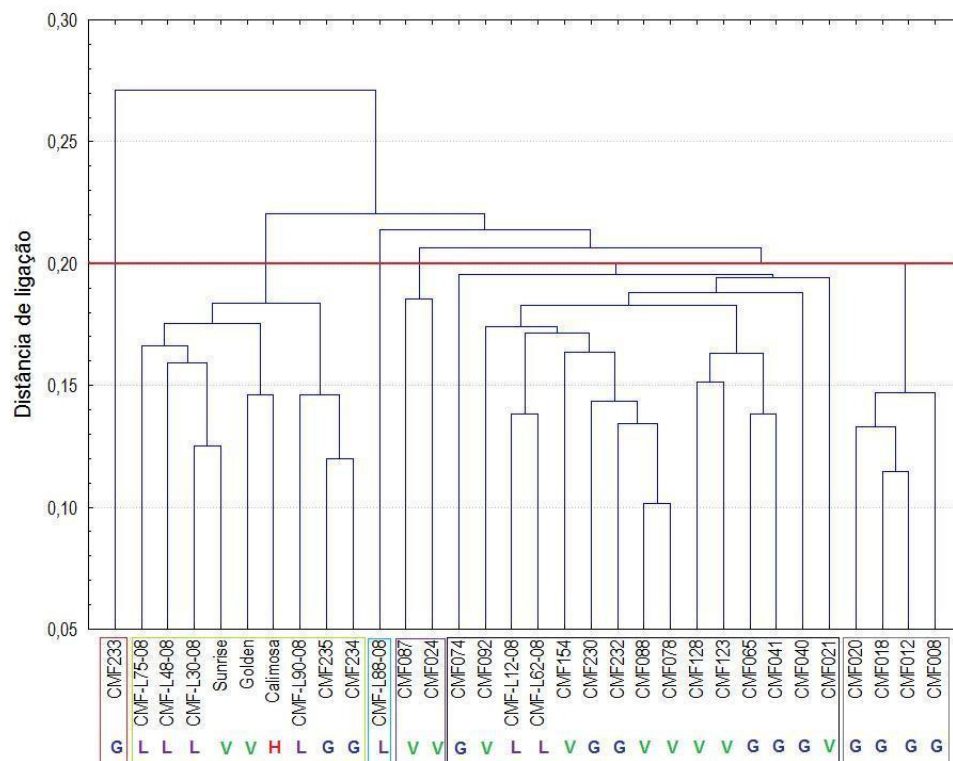


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, a partir da dissimilaridade genética entre 32 genótipos de mamoeiro, utilizando-se o coeficiente de similaridade de *Simple Matching* e marcadores do tipo AFLP. G=germoplasma; L=linhagem; V=variedade e H=híbrido.

Os acessos CMF088 e CMF078 apresentaram a maior similaridade genética, possuindo uma distância de ligação de 0,10. As principais variedades utilizadas comercialmente no Brasil Sunrise, Golden e o híbrido Calimosa, bem como quatro linhagens melhoradas e dois acessos de germoplasma estão no mesmo grupo, apesar de não estarem no mesmo ramo. A distância entre as variedades Sunrise e Golden foi de aproximadamente 0,14, o que demonstra que mesmo surgindo de mutação e seleção na variedade Sunrise, a variedade Golden ainda armazena considerável variabilidade genética.

O maior grupo foi formado por seis variedades antigas, duas linhagens melhoradas e seis acessos de germoplasma. O terceiro maior grupo foi formado somente por acessos de germoplasma (CMF020, CMF018, CMF012 e CMF008). As variedades com código CMF074 e CMF024, originárias do Brasil e Costa Rica, respectivamente permaneciam agrupadas. Também, observou-se o agrupamento isolado do germoplasma CMF233 e da linhagem melhorada CMF-L88-08. Esses resultados poderão auxiliar na definição de estratégias mais eficientes para serem utilizadas nos programas de melhoramento para o mamoeiro desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Conclusões

O marcador AFLP foi extremamente poderoso na detecção de polimorfismo na cultura do mamoeiro, permitindo a detecção de ampla variabilidade genética, até mesmo dentro das principais variedades comerciais. Ainda é possível concluir que as ações do Programa de Melhoramento Genético do CNPMF estão possibilitando o desenvolvimento de linhagens melhoradas com boas características produtivas e com incremento na diversidade genética da cultura atual, sobretudo nas linhagens CMF-L12-08, CMF-L62-08 e CMF-L88-08.

Referências Bibliográficas

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p. 299-306, 2001.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1987.

GANGA, R.M.D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E.G.M.; GRILI, G.V.G.; GONÇALVES, M.M.; HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G.M.; KNAPP, S.J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, v.95, p.400-407, 1997.

MARSAN, P.A.; CASTIGLIONI, P.; FUSARI, F.; KUIPER, M.; MOTTO, M. Genetic diversity and its relationship to Irbid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v.96, p.219-227, 1998.

OLIVEIRA, E. J. ; COSTA, J. L. ; SANTOS, L. F. ; BASTO, V. M. ; AMORIM, V. B. O. . Otimização da técnica de AFLP para o mamoeiro (*Carica papaya* L.). In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DA RGV DO ESTADO DA BAHIA, 3, 2008, Vitória da Conquista, Resumo expandido...Vitória da Conquista:UESB, 2008.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.VAN de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.;PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*,v. 21, p. 4407-4414, 1995.