

IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE MAMOEIRO POR SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

Aline dos Santos Silva¹, Eder Jorge de Oliveira², Fabiana Moraes de Carvalho³, Lucas Ferraz dos Santos⁴, Vanusia Batista de Oliveira Amorim⁵ e Jorge Luiz Loyola Dantas⁶

Resumo

O desenvolvimento de linhagens de mamoeiro pode levar vários anos, tendo em vista o ciclo relativamente longo da cultura (2 anos) e a necessidade de várias gerações de autofecundação para atingir um nível desejável de homozigosidade. O objetivo do presente trabalho foi utilizar a seleção assistida por marcadores microssatélites para reduzir o tempo na obtenção destas linhagens. Assim, utilizaram-se 83 supostas linhagens selecionadas do ponto de vista agrônomo em populações segregantes e em acessos de germoplasma do mamoeiro, com 27 locos de microssatélites. Foram identificadas 11 linhagens com coeficiente de endogamia igual 1 que serão utilizadas para obtenção de híbridos e avaliação per se para uso como variedades.

Introdução

Atualmente as variedades de mamoeiro mais cultivadas comercialmente pertencem aos grupos Solo e Formosa, desses dois grupos apenas três cultivares ocupam a maior parte dos plantios comerciais, o que tem prejudicado o desenvolvimento da cultura do mamoeiro pela restrita variabilidade genética. Nos últimos anos, o uso de híbridos de mamoeiro vem ganhando espaço nas áreas de produção. Entretanto, sua obtenção depende da existência de linhas puras, de forma a evitar segregações na geração F₁.

A obtenção de linhagens de mamoeiro pode chegar a 12 anos, considerando ciclo de dois anos e no mínimo seis gerações de autofecundação. Contudo, este tempo pode ser abreviado com o uso da seleção assistida por marcadores codominantes, como os microssatélites. Este tipo de marcador representa regiões de DNA com seqüências simples repetidas de 1 a 6 nucleotídeos, e geralmente tende a mostrar extensivo polimorfismo, que é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Além da capacidade de gerar altos níveis de polimorfismo, os microssatélites ainda possuem como vantagens, a alta reprodutibilidade, a simplicidade e a rapidez da técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de utilização e o grande poder de resolução (OLIVEIRA et al., 2006).

Assim, este trabalho foi conduzido com o objetivo de identificar linhagens de mamoeiro, previamente selecionadas por apresentarem alto potencial agrônomo em relação a características produtivas e de qualidade de frutos, por seleção assistida por marcadores microssatélites.

Material e Métodos

Para realização deste estudo utilizou-se o DNA de 83 plantas provenientes de populações segregantes (F₃) e de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mamoeiro (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. O DNA dos acessos foi extraído utilizando o protocolo com CTAB (brometo de centiltrimetilâmonio) descrito por Doyle; Doyle (1990), com modificações. A quantificação do DNA foi feita após eletroforese (3volts/cm) de alíquotas de cada amostra,

¹ Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: lineagro@yahoo.com.br

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

³ Estudante de Biomedicina da Faculdade Maria Milza, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: fabianamoraescarvalho@hotmail.com

⁴ Estudante de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, CEP 44380-000, E-mail: lufts@hotmail.com

⁵ Bolsista de DCR da FAPESB/CNPq desenvolvendo a pesquisa na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: vanusia@cnpmf.embrapa.br

⁶ Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: loyola@cnpmf.embrapa.br

Apoio financeiro: CNPq

comparando-as com uma série de concentrações conhecidas de DNA Lambda (Invitrogen), realizadas em géis de agarose 1,0%. A concentração de DNA foi estimada à partir da comparação visual das intensidades das bandas, reveladas pela coloração com brometo de etídeo.

Para as análises, foram testados 27 locos de SSR (Tabela 1). As reações de amplificação foram feitas em volume final de 15 µL, utilizando: 20 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,3 µM de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). As condições de amplificação foram feitas de acordo com as especificações de cada iniciador.

Os produtos resultantes das reações que apresentavam diferenças alélicas de até 10 pares de bases (pb) foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% e visualizados por coloração com prata (CRESTE; TULMANN NETO; FIGUEIRA, 2001). Enquanto aqueles com diferenças alélicas maiores de 10 pb foram separados em géis de agarose 1000 (Invitrogen) a 3%. O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb (Biolabs).

As estimativas de heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e coeficiente de endogamia foram obtidas com o auxílio do programa PowerMarker (LIU; MUSE, 2005).

Resultados e discussão

Sete locos foram monomórficos na avaliação das linhagens (CP17, CP31, CP34, CP36, CP44, CP57 e CP64). Para o restante dos locos observou-se número de alelos variando de 2 a 8. A heterozigosidade observada dos locos variou de 0,0 até 0,29 (Tabela1). Estas observações indicam a estrutura genética da população, que é baseada na autofecundação para aumento progressivo da endogamia.

A análise da heterozigosidade em nível de cada planta pode ser observada na Tabela 2, pelo coeficiente de endogamia (f) que variou de 0,634 a 1,00. As linhagens L36, L40, L42, L44, L45, L54, L58, L68, L73, L86 e L87, apresentaram coeficiente de endogamia igual a 1,00. Outras 18 linhagens (cerca de 21,7%) apresentaram coeficientes de endogamia variando de 0,953 a 0,961. A linhagem L62 foi a mais heterozigótica, com $f = 0,634$.

As onze linhagens de mamoeiro com $f = 1,00$ estão prontamente disponíveis para a produção de novos híbridos de mamoeiro, enquanto as 18 linhagens com f variando de 0,953 a 0,961, serão levadas a campo para observação da presença de segregação fenotípica na progênie. Não havendo segregação, estas também farão parte do banco de linhagens, com uso futuro na obtenção de cruzamentos em esquema de dialelos.

Conclusões

O uso da seleção assistida por marcadores microsatélites permitiu a identificação de linhagens de mamoeiro com alto nível de endogamia. Esta estratégia poderá reduzir enormemente o tempo para obtenção de novas linhagens e híbridos nos programas de melhoramento genético da cultura.

Referências

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, 1990.

LIU, K.; MUSE, S.V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, v21, p.2128–2129, 2005.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, v.3, p.175-182, 1993.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v.29, p.294-307, 2006.

Tabela 1. Características dos locos de microsatélites, como número de alelos, heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o), analisados em 83 plantas de mamoeiro selecionadas para identificação de linhagens

Loco	Número de alelos	H_e	H_o	Loco	Número de alelos	H_e	H_o
CP01	5,00	0,45	0,20	CP35	8,00	0,69	0,14
CP02	3,00	0,50	0,24	CP36	1,00	0,00	0,00
CP05	2,00	0,30	0,00	CP38	2,00	0,21	0,00
CP07	3,00	0,53	0,19	CP44	1,00	0,00	0,00
CP10	6,00	0,60	0,14	CP47	3,00	0,55	0,13
CP14	6,00	0,71	0,18	CP48	2,00	0,40	0,29
CP16	7,00	0,70	0,01	CP49	6,00	0,51	0,05
CP17	1,00	0,00	0,00	CP52	6,00	0,64	0,26
CP19	3,00	0,55	0,16	CP57	1,00	0,00	0,00
CP20	2,00	0,47	0,01	CP59	2,00	0,46	0,00
CP28	3,00	0,48	0,07	CP64	1,00	0,00	0,00
CP31	1,00	0,00	0,00	CP66	4,00	0,44	0,18
CP33	2,00	0,04	0,04	CP72	4,00	0,90	0,15
CP34	1,00	0,00	0,00				

Tabela 2. Relação das linhagens de mamoeiro com informações sobre a heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (f)

Genótipo	H_e	H_o	f	Genótipo	H_e	H_o	f
L36	0,94	0,00	1,000	L41	0,95	0,08	0,912
L40	0,94	0,00	1,000	L70	0,94	0,08	0,911
L42	0,95	0,00	1,000	L31	0,96	0,11	0,884
L44	0,94	0,00	1,000	L25	0,96	0,11	0,884
L45	0,95	0,00	1,000	L35	0,95	0,11	0,884
L54	0,94	0,00	1,000	L15	0,95	0,11	0,884
L58	0,93	0,00	1,000	L48	0,95	0,11	0,883
L68	0,95	0,00	1,000	L67	0,94	0,11	0,882
L73	0,95	0,00	1,000	L65	0,94	0,11	0,881
L86	0,95	0,00	1,000	L19	0,93	0,11	0,881
L87	0,95	0,00	1,000	L30	0,95	0,12	0,879
L43	0,95	0,04	0,961	L79	0,95	0,12	0,879
L33	0,95	0,04	0,961	L53	0,95	0,12	0,879
L78	0,94	0,04	0,961	L21	0,95	0,12	0,879
L14	0,96	0,04	0,960	L32	0,95	0,12	0,879
L23	0,95	0,04	0,960	L63	0,95	0,12	0,878
L37	0,95	0,04	0,960	L89	0,95	0,12	0,878
L52	0,95	0,04	0,959	L16	0,94	0,12	0,878
L66	0,94	0,04	0,959	L57	0,94	0,12	0,877
L10	0,94	0,04	0,959	L85	0,96	0,12	0,875
L50	0,94	0,04	0,959	L61	0,94	0,13	0,861
L80	0,95	0,04	0,958	L81	0,95	0,15	0,845
L38	0,95	0,04	0,958	L76	0,95	0,15	0,844
L72	0,95	0,04	0,958	L46	0,94	0,15	0,843
L83	0,95	0,04	0,958	L17	0,95	0,15	0,839
L20	0,95	0,04	0,956	L28	0,95	0,15	0,839
L39	0,94	0,04	0,954	L34	0,95	0,15	0,839
L60	0,94	0,04	0,954	L18	0,95	0,15	0,839
L56	0,93	0,04	0,953	L12	0,95	0,15	0,839
L11	0,95	0,07	0,922	L47	0,95	0,15	0,839
L77	0,95	0,07	0,922	L90	0,95	0,15	0,838
L22	0,96	0,08	0,920	L75	0,95	0,15	0,838
L74	0,95	0,08	0,919	L88	0,95	0,16	0,832
L84	0,95	0,08	0,919	L59	0,95	0,16	0,832
L71	0,95	0,08	0,919	L27	0,95	0,16	0,832
L26	0,95	0,08	0,919	L82	0,95	0,16	0,831
L51	0,95	0,08	0,919	L13	0,95	0,19	0,798
L09	0,94	0,08	0,919	L49	0,94	0,19	0,796
L08	0,94	0,08	0,919	L55	0,94	0,20	0,789
L24	0,94	0,08	0,918	L64	0,93	0,24	0,743
L69	0,95	0,08	0,916	L62	0,94	0,35	0,634
L29	0,94	0,08	0,915				