

POLIMORFISMO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NO GERMOPLASMA DE MAMOEIRO

Vanusia Batista de Oliveira Amorim¹, Eder Jorge de Oliveira², Juliana Leles Costa³, Jorge Luiz Loyola Dantas⁴, Milene da Silva Castellen⁵ e Edneide Luciana Santiago Matos⁶

Resumo

A pesquisa genômica em mamoeiro (*Carica papaya* L.), tem resultado em quantidade significativa de sequências depositadas no banco de dados, que podem ser úteis, por exemplo, na identificação de marcadores moleculares, como os microssatélites. Este trabalho objetivou a caracterização de 81 locos de microssatélites desenvolvidos para o mamoeiro, por meio da estratégia de mineração de dados no Genbank. Para isso, foram utilizados 30 acessos do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e 18 genótipos locais. A maioria dos locos (73%) foram polimórficos, com número de alelos variando de 2 a 11. Também observou-se que cerca de 44% dos locos apresentaram valores de PIC acima de 0,50. Estes marcadores podem ser utilizados como ferramentas moleculares na cultura do mamoeiro, com grandes vantagens em relação a outros marcadores.

Introdução

Os microssatélites (*Single Simple Repeat* – SSR) são sequências curtas compostas por repetições simples de um a seis nucleotídeos, especialmente importantes para uso como marcadores codominantes, multialélicos. Além disso, esses marcadores são altamente polimórficos e espalhados pelo genoma, o que possibilita ampla cobertura dos cromossomos para os mais diversos estudos genéticos. Devido a todas estas vantagens, os marcadores do tipo microssatélites são utilizados em diversas culturas como ferramentas moleculares extremamente úteis.

Até recentemente, poucos locos de microssatélites haviam sido descritos para o mamoeiro. Entretanto, o aumento no volume de depósito de sequências de DNA nos bancos de dados, sobretudo no Genbank, possibilitou o desenvolvimento de um grande número de locos de microssatélites que podem incrementar a dinâmica das respostas dos programas de melhoramento aos principais entraves agrônômicos da cultura, sobretudo pela possibilidade da implementação da seleção assistida (OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, a caracterização prévia da capacidade informativa dos locos de microssatélites é essencial para o efetivo uso dos mesmos nas mais diversas análises moleculares. Assim, o objetivo deste trabalho foi a caracterização de locos de microssatélites em genótipos coletados no município de Muritiba (BA) e em acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mamoeiro (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, visando a identificação do seu potencial em gerar polimorfismos moleculares.

Material e Métodos

Foram genotipados 18 genótipos de mamoeiro coletados em pequenas propriedades no Município de Muritiba (BA) e 30 acessos do BAG-Mamão com 81 locos de microssatélites. As reações de amplificação

¹Bolsista 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

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

³Estudante de Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000 Cruz das Almas, BA. E-mail: julianaleles_17@hotmail.com

⁴Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: loyola@cnpmf.embrapa.br

⁵Pesquisadora da Embrapa Sede, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final), CP02372 Brasília, DF. E-mail: milene.castellen@embrapa.br

⁶Estudante de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/Embrapa, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: edneidematos@yahoo.com.br

Apoio Financeiro: SECTI/FAPESB, CNPq

foram feitas em volume final de 20 μ L, utilizando: 20,0 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP, 0,3 μ M de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As amplificações foram feitas em termociclador PTC-100 (MJ Research), de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 4 min; 30 ciclos a 94 °C por 50s, (temperatura de anelamento variando de 55 a 60 °C de acordo com o iniciador – Tabela 1) por 50s, 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos resultantes das reações que apresentaram diferenças alélicas de até 10 pares de bases (pb) foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6% e visualizados por coloração com prata (CRESTE et al., 2001), utilizando o sistema eletroforético *Hoefer SQ3 Sequencer* (Pharmacia Biotech), 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 que caracterizam os locos, como o número de alelos por loco, heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e conteúdo informativo (PIC - *Polymorphic information content*) foram obtidas com o auxílio do programa PowerMarker (LIU & MUSE, 2005).

Resultados e Discussão

Dos 81 locos de microssatélites analisados, apenas 22 (27%) foram monomórficos, o restante apresentou dois ou mais alelos (Tabela 1). Esta eficiência de 73% de locos polimórficos pode ser aumentada, pela ampliação do número de indivíduos analisados do BAG-Mamão, o que permitiria a identificação de polimorfismos ainda não observados.

O número de alelos nos locos polimórficos variou de 2 a 11, com uma média de 3 alelos por loco. O baixo número de alelos de microssatélites ressalta a restrita variabilidade genética presente na espécie *Carica papaya* L. Contudo, é possível destacar os locos CP16 com 11 alelos; CP61 e CP54 com 8 e 7 alelos respectivamente; CP10, CP49, CP51, CP53, CP71, CP94 e CP95 com 6 alelos; e CP14, CP30, CP35, CP42, CP55, CP59, CP62, CP66 e CP73 com 5 alelos por loco, como marcadores extremamente importantes nos estudos moleculares associados ao desenvolvimento de novas variedades de mamoeiro.

Para todos os locos de microssatélites, observou-se que a heterozigosidade observada (H_o) foi menor do que a esperada (H_e), estimada com base na frequência alélica. Tal observação pode ser explicada pela existência de endogamia decorrente das autofecundações, que leva à redução do número de heterozigotos na população.

Em ambos os casos, percebe-se uma distribuição não homogênea das frequências alélicas entre os locos analisados, com observações variando de 0,08 a 0,82 para H_e e 0,0 a 1,0 para H_o (Tabela 1), indicando a ocorrência de eventos evolutivos ou seletivos diferenciados, ao longo dos anos, entre os diversos locos avaliados.

Com relação ao PIC, as estimativas variaram de 0,08 a 0,81. O maior de PIC foi observado para o loco CP16 (0,81) que possui repetição do tipo (AT)₁₃ e o maior número de alelos. Estimativas de PIC maiores do que 0,60 também foram encontradas nos locos CP03, CP05, CP07, CP10, CP31, CP35, CP42, CP44, CP47, CP49, CP51, CP53, CP54, CP55, CP57, CP61, CP71, CP72, CP73, CP83, CP94, CP95 e CP97. Embora, poucos alelos tenham sido detectados, metade dos locos de microssatélites analisados possui valores de PIC considerados informativos (valores acima de 0,50).

Tabela 1: Sequência dos iniciadores e características dos microssatélites otimizados testados em 48 genótipos de mamoeiro.

Locos	Motivo do microssatélite	Ta (°C)	Tamanho do alelo (pb)	Nº de alelos	H _e	H _o	PIC
CP02	(AGG)9	59	144-158	3	0,62	0,33	0,54
CP03	(AATA)7	58	238-276	4	0,66	0,32	0,61
CP04	(AGA)5 + (AG)21	57	476	1	0,00	0,00	0,00
CP05	(AT)17	57	290-320	4	0,69	0,04	0,63
CP06	(TGCCA)4	58	240-320	2	0,49	0,04	0,37
CP07	(GT)12gct(GT)13	60	175-208	4	0,71	0,50	0,66
CP09	(AT)10 + (CT)14(AT)12	59	395-411	2	0,30	0,00	0,26
CP10	(TACA)4(TA)9(GA)10	58	180-202	6	0,73	0,28	0,69
CP11	(AT)9 + (TA)12 + (TA)8	58	568-610	2	0,41	0,25	0,33
CP12	(ATT)7	57	196	1	0,00	0,00	0,00
CP13	(AT)7 + (TA)6(TG)8	59	382	1	0,00	0,00	0,00
CP14	(AC)9(AT)8	56	217-232	5	0,52	0,00	0,46
CP15	(TG)5(TA)7tg(TA)6 + (AT)9	57	481	1	0,00	0,00	0,00
CP16	(AT)13	60	202-250	11	0,82	0,67	0,81
CP18	(TA)12	57	238-260	4	0,54	0,23	0,47
CP19	(AT)7t(AT)8	58	156-166	3	0,51	0,21	0,43
CP20	(AT)5(TG)8	58	248-252	2	0,35	0,25	0,29
CP21	(GT)12	60	142-158	4	0,64	0,46	0,57
CP22	(TA)16	59	246-254	2	0,08	0,00	0,08
CP23	(GT)11	57	218-236	2	0,44	0,21	0,35
CP24	(GAA)7	60	236-246	2	0,35	0,25	0,29
CP25	(TTC)8	58	250	1	0,00	0,00	0,00
CP26	(CA)10(TA)6	60	142-152	3	0,48	0,04	0,41
CP27	(AT)17	58	347-353	2	0,38	0,00	0,31
CP28	(CA)9(TA)11	56	186-190	2	0,48	0,08	0,36
CP29	(AT)20 + (AT)14	58	550-556	2	0,41	0,13	0,33
CP30	(AG)17	58	222-290	5	0,58	0,38	0,53
CP31	(AT)6(GT)10	57	160-174	4	0,73	1,00	0,68
CP32	(AT)8(AG)8	58	242	1	0,00	0,00	0,00
CP33	(ATTAA)5 + (TAA)9	59	401-411	2	0,29	0,23	0,25
CP35	(TA)12	59	162-180	5	0,73	0,25	0,69
CP36	(AT)12 + (TA)10	55	452-458	2	0,50	0,27	0,37
CP37	(AAT)8	59	225	1	0,00	0,00	0,00
CP38	(AAT)11	57	498-510	2	0,39	0,35	0,31
CP39	(AG)12	59	230	1	0,00	0,00	0,00
CP40	(AC)17	60	154-170	4	0,55	0,23	0,51
CP42	(AT)16	56	260-280	5	0,66	0,22	0,60
CP44	(AT)12	56	228-236	4	0,75	0,56	0,70
CP46	(AT)5(AG)8	56	168	1	0,00	0,00	0,00
CP47	(TA)14	60	248-262	4	0,68	0,00	0,63
CP48	(TC)13	59	210-250	3	0,51	0,62	0,43
CP49	(AT)12	56	196-216	6	0,73	0,63	0,68
CP51	(AT)16	59	290-310	6	0,77	0,38	0,73
CP52	(AT)10(AG)12	55	186-205	3	0,66	0,00	0,59
CP53	(AAC)8	56	305-320	6	0,70	0,08	0,65
CP54	(AT)10 + (ATA)7	56	270-290	7	0,76	0,43	0,73
CP55	(AT)12	60	250-270	5	0,73	0,00	0,68
CP56	(ATG)6	59	206	1	0,00	0,00	0,00
CP57	(CA)6(TA)7	56	280-290	4	0,70	0,00	0,63
CP58	(TTG)7	58	357-367	3	0,66	0,11	0,58
CP59	(TA)7 + (AT)12	60	367-378	5	0,59	0,00	0,51
CP61	(AT)12 + (AC)8	57	207-220	8	0,81	0,21	0,78
CP62	(AT)8 + (AAG)10	59	240-260	5	0,65	0,35	0,58
CP63	(AT)14	56	235-249	3	0,51	0,00	0,40
CP64	(TC)17	60	240	1	0,00	0,00	0,00
CP66	(TG)9cgc(GA)12	60	244-270	5	0,59	0,18	0,50
CP67	(TTC)10	59	240	1	0,00	0,00	0,00
CP68	(AG)15	60	141-155	4	0,59	0,00	0,51
CP69	(TA)12	59	350-377	4	0,52	0,00	0,47
CP70	(TTC)9	60	220	1	0,00	0,00	0,00
CP71	(CT)14	59	240-260	6	0,79	0,39	0,76
CP72	(ATAC)7(AT)6	58	190-205	4	0,65	0,00	0,60
CP73	(AT)5gt(AT)9	58	225-242	5	0,73	0,00	0,68
CP74	(TTA)8	59	200	1	0,00	0,00	0,00
CP75	(GA)13 + (AG)7	59	178	1	0,00	0,00	0,00

Cont...

Locos	Motivo do microssatélite	Ta (°C)	Tamanho do alelo (pb)	Nº de alelos	H _e	H _o	PIC
CP78	(TTA)7 + (TTTA)5	57	270	1	0,00	0,00	0,00
CP79	(TA)17	60	185	1	0,00	0,00	0,00
CP80	(TC)12	59	207-220	3	0,64	0,00	0,56
CP81	(CT)15	58	290	1	0,00	0,00	0,00
CP82	(AAT)7	59	240	1	0,00	0,00	0,00
CP83	(TA)5(CT)9	59	240-245	4	0,73	0,00	0,68
CP86	(AT)12	59	447-451	3	0,27	0,08	0,24
CP89	(AT)12 + (AT)11	58	423-450	3	0,34	0,00	0,30
CP90	(T)21(CTT)5	59	142	1	0,00	0,00	0,00
CP92	(ATT)11	59	370	1	0,00	0,00	0,00
CP94	(AG)12at(AG)7	58	170-180	6	0,79	0,00	0,76
CP95	(AG)6tg(AG)7	60	180-192	6	0,73	0,00	0,70
CP97	(TA)11	56	248-265	4	0,70	0,00	0,65
CP98	(TC)13	56	194-200	4	0,53	0,14	0,48
CP99	(AG)24	60	245	1	0,00	0,00	0,00
CP100	(GA)11 + (AG)23	58	282-305	4	0,67	0,00	0,61

Ta: temperatura de anelamento; H_e: heterozigiosidade esperada de acordo com Nei (1973); H_o: heterozigiosidade observada = porcentagem de indivíduos que são heterozigotos no loco; PIC: conteúdo de informação do polimorfismo

Conclusões

Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de 36 locos de microssatélites com PIC acima de 0,5, que poderão ser utilizados nos estudos de fiogenia, estruturação da diversidade genética e na seleção assistida de plantas.

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.

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

OLIVEIRA, E.J.; DANTAS, J.L.L.; CASTELLEN, M.S.; MACHADO, M.D. Identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio da exploração do banco de dados de DNA. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, p. 841-845. 2008.