

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOÇA E FRUTICULTURA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE MAMOEIRO COM O  
USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

EDNEIDE LUCIANA SANTIAGO MATOS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
MAIO - 2010

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE MAMOEIRO COM O  
USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

**EDNEIDE LUCIANA SANTIAGO MATOS**

Engenheira Agrônoma  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2007

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais

**Orientador: Prof. Dr. JORGE LUIZ LOYOLA DANTAS**

**Co-Orientador: Prof. Dr. EDER JORGE DE OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2010

M425

Matos, Edneide Luciana Santiago

Caracterização molecular de acessos de mamoeiro com uso de marcadores microssatélites / Edneide Luciana Santiago Matos.\_Cruz das Almas, BA, 2010.

f. 69 ; il.

Orientador: Jorge Luiz Loyola Dantas

Co-orientador: Eder Jorge de Oliveira

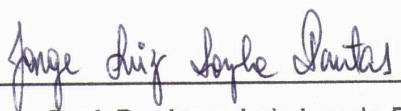
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Área de Concentração: Melhoramento e Biotecnologia Vegetal.

1. Mamão - cultura. 2 I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias e Tecnológicas. II. Título.

CDD 634.651

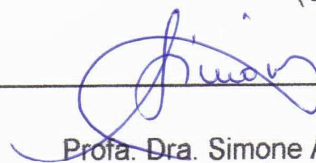
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA  
ALUNA EDNEIDE LUCIANA SANTIAGO MATOS



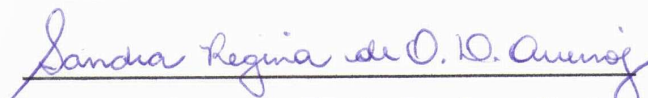
Prof. Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB  
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical  
(Orientador)



Profa. Dra. Simone Alves Silva

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Profa. Dra. Sandra Regina de Oliveira Domingos Queiroz  
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos  
Genéticos Vegetais ..... Conferindo o Grau de Mestre  
em Recursos Genéticos Vegetais em .....

## DEDICATÓRIA

**A Deus,**

À minha família,

Principalmente à minha mãe, Maria Ramira Santiago Matos, por ser minha fortaleza, sempre buscando me apoiar em todas as decisões, contribuindo, na sua totalidade, para a concretização desse sonho, e à minha querida filha Maíra Matos Cerqueira, que nas horas de angústias e de desespero me incentivava a continuar com seu sorriso lindo me dizendo: **“mamãe chora não, bora brincar”?**

Dedico

Ao meu pai Wanderby Matos

Aos meus Irmãos Wanderby Matos Junior,  
Marcel Santiago Matos e Diego Santiago Matos.

Ofereço

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre auxiliando e guiando meus passos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB (antiga Escola de Agronomia da UFBA), pela oportunidade de ter realizado o Curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), pela concessão da bolsa e apoio financeiro ao Projeto de Pesquisa.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelo apoio e infraestrutura concedida.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas, pela doutrina, atenção e convívio amigável prestado durante a orientação.

Ao Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira, pela co-orientação, e colaboração nas análises estatísticas.

Aos laboratoristas e estagiários do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular (LVBM) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em especial ao Sr. Epaminondas do Patrocínio, pela boa vontade e pela capacidade de não medirem esforços para estarem sempre prontos a colaborar.

À Bibliotecária Isaelse Santos Silva, pela ajuda na revisão bibliográfica.

A todos os colegas de curso, Crispiniano, Ivonilda, Laurenice, Lívia e Rosa Karla, pelo convívio amigável durante esta caminhada e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos Paulo Laesso Ribeiro Lima, Alexandra Pereira dos Santos, Marcos André Oliveira, Derivaldo Nicomedes e Andréa Patrício, por estarem sempre me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta dissertação.

*“Muitas das coisas mais importantes do mundo foram conseguidas por pessoas que continuaram tentando quando parecia não haver mais nenhuma esperança de sucesso”*

*Dale Carnegie*

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
 Capítulo 1	
USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE MAMOEIRO.....	19
 Capítulo 2	
ESTRUTURAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE MAMOEIRO DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE MAMÃO (BAG-MAMÃO) DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL.....	40
 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57



## **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE MAMOEIRO COM O USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Autora: Edneide Luciana Santiago Matos

Orientador: Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas

Co-Orientador: Dr. Eder Jorge de Oliveira

**RESUMO:** O mamoeiro é uma fruteira encontrada em quase todos os países da América Tropical, sendo o Brasil classificado como principal produtor mundial da fruta, participando com 25% do mercado mundial. O objetivo do trabalho foi avaliar 96 acessos de mamoeiros provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão), da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), por meio da caracterização molecular com o uso de marcadores microssatélites. Para a extração do DNA genômico foi aplicado o método de Doyle & Doyle com algumas modificações. Foram selecionados 15 iniciadores polimórficos. Para a técnica de microssatélites, os fragmentos de DNA gerados com cada iniciador foram avaliados em géis de agarose 1000 a 3%, corados com brometo de etídio ou em géis desnaturantes de poliácridamida 6%, corados com nitrato de prata. O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb (New England Biolabs). Os acessos foram avaliados quanto às frequências alélicas, à heterozigosidade, o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), o coeficiente de endogamia e quanto à estruturação da diversidade genética. Os 15 pares de iniciadores amplificaram 68 alelos. A média do número de alelos por loco ( $N_A$ ) foi 4,5. O PIC apresentou valores variando de 0,189 a 0,691 sendo o maior valor encontrado para o iniciador CP16. Para todos os locos de microssatélites selecionados a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) foi menor que a esperada ( $H_E$ ). O alto índice médio de endogamia estimado (0,672) e o excesso de homozigotos detectados indicam a existência de endogamia entre os acessos analisados. A análise da estruturação genética a partir do dendograma gerado pela matriz de distância genética permitiu a formação de 23 grupos, evidenciando a divergência genética dos genótipos e potencialidades para aumentar a variabilidade genética por meio do desenvolvimento de novas variedades.

**Palavras-chave:** *Carica papaya* L., polimorfismo, recursos genéticos

## **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PAPAYA ACCESSIONS USING MICROSATELLITES MARKERS**

Author: Edneide Luciana Santiago Matos

Adviser: Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas

Co-Adviser: Dr. Eder Jorge de Oliveira

**ABSTRACT:** The papaya tree is found in almost every country of tropical America and Brazil is ranked as the world's leading producer, contributing with 25% of the market. The objective of this study was to evaluate 96 papaya accessions from the Papaya Active Germplasm Bank (Papaya-AGB) of Embrapa Cassava and Tropical Fruits (CNPMPF) by molecular characterization using microsatellites markers. For genomic DNA extraction the Doyle & Doyle method with some modifications was used. Fifteen polymorphic primer pairs were selected. DNA fragments generated with each microsatellite primer pair were separated in 1000-3% agarose gels stained with ethidium bromide and in 6% polyacrylamide denaturing gels stained with silver nitrate. The size of the polymorphic loci was determined by comparison with the 50-bp mass ruler. The accessions were evaluated for allele frequencies, heterozygosity, polymorphism information content (PIC), inbreeding index and structure of genetic diversity. The 15 primer pairs amplified 68 alleles. The mean number of alleles per locus (NA) was 4.5. The PIC values ranged from 0.189 to 0.691 with the highest value found for primer CP16. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) was lower than the expected heterozygosity ( $H_e$ ), for all selected microsatellites loci. The high estimate of inbreeding index (0.672) and excess of homozygotes detected, indicate the presence of inbreeding among the accessions analyzed. The genetic structure inferred from the dendrogram generated with the genetic distance matrix showed 23 groups, what confirms the genetic divergence of the genotypes and the potential to increase genetic variability by developing new varieties.

**Keywords:** *Carica papaya* L., polymorphism, genetic resources.

## INTRODUÇÃO

### Aspectos botânicos e origem

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta herbácea, nativa da América tropical pertencente à classe Dicotiledônea, subclasse Archiclamydeae, ordem Violales, família Caricaceae. Até recentemente, a família Caricaceae compreendia 31 espécies distribuídas em três gêneros da América tropical, *Carica*, *Jacaratia* e *Jarilla*, e um quarto gênero, *Cylicomorpha*, da África equatorial (NAKASONE; PAULL, 1998). Contudo, uma revisão taxonômica mais recente propõe que algumas espécies classificadas no gênero *Carica* sejam inseridas no gênero *Vasconcellea* (BADILLO, 2001). Dessa forma, a classificação da família Caricaceae tem sido revisada para abranger o gênero africano *Cylicomorpha* e cinco gêneros das Américas do Sul e Central (*Carica*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Vasconcellea* e *Horovitzia*), com *Carica papaya* L. sendo a única espécie dentro do gênero *Carica* (BADILLO, 2001). A criação dos gêneros da família Caricaceae pode ser assim resumida:

**Carica:** foi o primeiro gênero a ser criado com base na descrição de *C. papaya* feita por Linnaeus, em 1753. É diplóide com  $2n=2x=18$ , ou seja, possui número básico de cromossomos haplóides ou genoma  $n=9$  (STOREY, 1941). Compreendia a grande maioria das espécies de Caricaceae, porém, atualmente é considerado um gênero monoespecífico.

**Jarilla:** criado em 1832 com o nome de *Mocinna*, teve seu nome substituído em 1921 por *Jarilla*. O México é considerado seu centro de origem, embora algumas espécies sejam encontradas também na Guatemala. A característica que o diferencia dos demais gêneros da espécie é a presença de anteras de uma só teca em uma série superior de estames (BADILLO, 1971).

**Vasconcellea:** foi criado por St. Hilaire em 1837, como um gênero da família Caricaceae. Esta classificação foi mantida até 1889, quando Solms, em

sua obra *Flora Brasiliensis*, voltou a utilizar *Carica* em sentido amplo, considerando-a uma espécie do gênero *Carica*. Todavia, em nova reclassificação efetuada por Badillo (2000), com base em caracteres morfológicos, taxonômicos e moleculares, voltou a constituir-se em um gênero da família *Caricaceae*, sendo o maior gênero dentro da família *Caricaceae*, compreendendo 21 espécies (BADILLO, 2000, 2001).

***Jacaratia***: criado por De Candolle em 1864. Tem como centro de origem a América do Sul e é formado por sete espécies arbóreas. Possui ampla distribuição, desde o México até o norte da Argentina. Segundo Badillo (1971), apresenta como característica a presença de glândulas microscópicas na epiderme adaxial das folhas.

***Cylicomorpha***: criada em 1901 por Urban. Gênero de origem africana, formado por duas espécies (*Cylicomorpha solmsii* e *C. parviflora*). Estudos recentes sugerem que este pode ser o tipo primitivo que teria originado os demais gêneros (OLSON, 2002; KYNDT et al., 2005).

***Horovitzia***: este é o mais recente gênero, criado por Badillo em 1993, formado por uma única espécie (*H. cnidoscoloides*) nativa do México.

## **Biologia floral**

Devido à diversidade de formas florais que são observadas no campo, as flores do mamoeiro têm sido classificadas de diferentes maneiras. Porém, podem ser divididas, basicamente, em três tipos bem diferenciados: flor hermafrodita, que caracteriza as plantas hermafroditas; flor estaminada, que caracteriza plantas masculinas; e flor pistilada, que caracteriza uma planta feminina típica (MEDINA; CORDEIRO, 1994).

De acordo com Hofmeyr (1939) e Storey (1941), podem ocorrer alterações nos tipos florais, causadas principalmente por fatores genéticos e ambientais. A amplitude dessa transição de sexos é dependente da variedade, idade da planta e do ambiente (STOREY, 1941). A reversão sexual ocorre principalmente no tipo hermafrodita. Sua transição em direção às formas mais femininas é induzida por condições favoráveis de crescimento, enquanto condições desfavoráveis, incluindo o aumento de temperatura, fazem com que esta transição tenda para o lado masculino (HOFMEYR, 1939; STOREY, 1941).

Segundo Couto e Nacif (1999) pode haver variações na flor hermafrodita do mamoeiro quando estas sofrem estímulos externos, principalmente devido a determinadas condições ambientais. Dessa forma, podem ser encontradas nas populações de plantas hermafroditas flores dos tipos carpelóide, pentândrica e estéril.

A carpeloidia é um tipo de deformação floral provocada pela transformação dos estames em carpelos durante o primeiro período de desenvolvimento da flor, de modo que carpelos normais, juntamente com o ovário, são supressos em vários graus de desenvolvimento, dando origem a frutos deformados, conhecidos como “cara de gato”, e impróprios para a comercialização (COUTO; NACIF, 1999). De acordo com Awada e Ikeda (1957), citados por Nakasone (1980), condições de alta umidade no solo, baixas temperaturas e excesso de nitrogênio no solo favorecem a produção de frutos carpelóides, sendo a temperatura o fator mais importante.

Na flor hermafrodita pentândrica as pétalas são soldadas e inseridas na base do ovário. Ocorrem 5 estames em vez de 10, conforme observado na flor hermafrodita típica ou alongada, daí a denominação pentândrica. Os frutos formados são arredondados, com cinco sulcos longitudinais profundos, caracterizando-os de modo inconfundível (COUTO; NACIF, 1999).

A flor hermafrodita estéril é resultante da influência de causas genéticas de diferentes origens como mutações gênicas, aberrações cromossômicas e incompatibilidade em nível gênico ou cromossômico entre os genomas parentais de um determinado híbrido, bem como por influências de causas ambientais como período de calor e estresse causados por umidade, daí ser conhecida como esterilidade de verão. Neste tipo floral o pistilo se apresenta atrofiado, tornando-se não funcional, sendo a flor, neste caso, considerada essencialmente masculina e funcional, ou seja, ocorre a reversão do sexo de hermafrodita para masculina. Por esse motivo ela não produz frutos, tornando-se assim, indesejável. Arkle Júnior e Nakasone (1984) constataram que o início da esterilidade ocorre durante a fase de diferenciação do ovário, geralmente seis a sete semanas antes da abertura das flores.

Os diferentes formatos dos frutos do mamoeiro são determinados pelo sexo das flores. Geralmente plantas masculinas não produzem frutos e quando o fazem, estes não tem valor comercial. As plantas femininas produzem frutos de

formato arredondado ou ligeiramente ovalados, cuja cavidade interna é maior em relação à espessura da polpa, o que os desvaloriza comercialmente. Os frutos produzidos pelas plantas hermafroditas são considerados o tipo de fruto ideal exigido pelos mercados interno e externo, por ter formato alongado apresentando uma cavidade interna pequena em relação à polpa.

Segundo Dantas e Castro Neto (2000), a flor hermafrodita alongada é que dá origem ao fruto com valor comercial. Esse tipo de flor apresenta diâmetro pequeno, sempre em ráculos de pedúnculos curtos, e corola gamopétala, com tubo quase tão longo quanto as pétalas. Os estames são em número de dez, todos funcionais, dispostos em duas séries no ápice do tubo da corola, sendo cinco alternados às pétalas e cinco opostos. O pistilo em geral tem cinco carpelos e os ovários alargados na base, com diâmetro muito menor que o da flor pistilada. O fruto possui formato alongado, com variações de piriforme a cilíndrico, pequena cavidade interna, sendo, portanto, ideais para os plantios comerciais.

Como a identificação do sexo das plantas só pode ser visualizada na época do primeiro florescimento, 3 a 5 meses após plantio, por meio dos botões florais, os produtores têm que triplicar o número de mudas no campo visando diminuir as possíveis perdas, o que termina, no entanto, por contribuir para o encarecimento dos custos de produção, além de promover excessiva competição entre plantas nas fases iniciais de seu desenvolvimento (ANDREANI Jr., 1998).

Atualmente é possível identificar precocemente o sexo das plantas de mamoeiro com o uso de marcadores moleculares. Oliveira et al. (2007), utilizaram marcadores do tipo SCAR e RAPD na predição do sexo de variedades do grupo Solo e de híbridos do grupo Formosa, obtendo-se correta identificação do sexo em ambos os grupos em relação ao marcador RAPD BC210. Esta identificação sexual precoce, realizada por meio dos marcadores moleculares, revela grande potencial para ser usada na seleção assistida em genótipos cultivados comercialmente.

### **Expressão sexual**

Os estudos em mamoeiro têm demonstrado que a expressão sexual nas plantas está sob controle genético, sendo um caráter de herança simples, ou seja, monogênico, com três formas alélicas. O mamoeiro possui três tipos ou formas sexuais típicas: ginóica (plantas femininas), andróicas (plantas masculinas) e

andromonóica (plantas com inflorescências hermafroditas) (STOREY, 1953). Em nível de campo, estas formas sexuais só são possíveis de serem distinguidas durante o início do florescimento, quando as plantas apresentam de 3 a 5 meses de idade.

O mamoeiro cultivado é do tipo ginóico andromonóico (plantas femininas e hermafroditas). Para a produção de sementes, o cruzamento entre plantas hermafroditas levará à obtenção, na próxima geração, de maior frequência de plantas hermafroditas (67%) em relação às femininas (33%), correspondendo a uma proporção de 2:1. O cruzamento de plantas femininas com hermafroditas elevará a frequência de plantas femininas na geração seguinte para 50%, ou seja, uma proporção de 1:1 de hermafroditas para femininas.

Em seu estudo sobre a herança do sexo, Storey (1953) mostrou que as plantas femininas são geneticamente homozigotas para o alelo  $m$  e as plantas masculinas e hermafroditas são heterozigotas para os alelos  $M_1$  e  $M_2$ , respectivamente, formando as combinações:  $mm$  (plantas femininas),  $M_1m$  (plantas masculinas) e  $M_2m$  (plantas hermafroditas). O autor ainda relata em seu estudo que as combinações  $M_1M_1$  e  $M_2M_2$  não existem porque são letais zigóticas.

Segundo Martins e Costa (2003), o loco simplesmente herdado, na realidade, representa um complexo de muitos genes fortemente ligados, afetando características sexuais secundárias, como número de flores, comprimento do pedúnculo, supressão do crossing-over e letalidade.

Conforme descrito por Hofmeyr (1938), a ação do vento, dos insetos ou do próprio homem, promove a ocorrência dos seguintes casos de cruzamentos entre os três tipos de flores:

- **Flor Masculina x Flor Feminina:** nesse tipo de cruzamento as sementes produzidas poderão originar 50% de plantas masculinas e 50% de plantas femininas, aproximadamente.

- **Flor Hermafrodita x Flor Feminina:** as sementes obtidas desse cruzamento deverão dar origem a 50% de plantas hermafroditas e 50% de plantas femininas. Este tipo de cruzamento não é desejável em plantios comerciais, devido à excessiva população de plantas femininas.

- **Flor Masculina x Flor Hermafrodita:** as sementes desse cruzamento normalmente produzirão uma geração de descendentes em uma proporção de

aproximadamente 33% de plantas hermafroditas, 33% de plantas masculinas e 33% de plantas femininas. Esse tipo de cruzamento é indesejável em condições de cultivos comerciais, pois origina plantas masculinas improdutivas e plantas femininas com baixo valor comercial.

- **Flor Hermafrodita x Flor Hermafrodita**: nesse cruzamento serão produzidas sementes que deverão originar em torno de dois mamoeiros hermafroditas para um feminino.

### **Aspectos econômicos da cultura**

De todas as espécies existentes na família *Caricaceae*, apenas *C. papaya* possui importância comercial significativa. Por outro lado, diversas espécies de *Vasconcellea* são consideradas importantes repositórios de genes de interesse ao melhoramento do mamoeiro (DREW et al., 1998).

Os principais países produtores de mamão são Brasil, México, Nigéria, Índia, Indonésia, Venezuela, Bolívia e China, nessa ordem (BRAPEX, 2009). As Américas detêm as maiores produções desta fruta, seguidas do continente asiático como segundo maior produtor de mamão, em terceira posição o continente africano, e por último a Oceania, que apresenta uma produção irrisória.

Em 2008 o Brasil produziu aproximadamente 1,89 milhão de toneladas, participando com cerca de 20,8% do mercado mundial, que foi de 9,1 milhões de toneladas. Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial da fruta, suas exportações precisam de um impulso, pois o país ocupa a terceira posição no *ranking* mundial, exportando cerca de 30 mil toneladas (IBRAF, 2008).

Segundo dados do IBGE (2006), no Brasil o mamoeiro merece destaque por representar uma das principais fruteiras de exportação e movimentar cerca de 780 milhões de reais em volume de negócios. Seu cultivo concentra-se na microrregião do Extremo sul da Bahia e na região Norte do Espírito Santo, consideradas as maiores regiões produtoras brasileiras.

No ano de 2008, o Brasil cultivou 37 mil hectares de mamão. A Região Nordeste foi responsável por 64,2% da área plantada, com 23,8 mil hectares e colheita anual de cerca de 1.179 mil toneladas. A seguir, posiciona-se o Sudeste, com 24,2% da área plantada, perfazendo 8,97 mil hectares e 660 mil toneladas; em terceiro está o Norte, com 9,5% dos pomares, totalizando 3,5 mil hectares e 37 mil toneladas. As regiões Sul (1,2% da área) e Centro-Oeste (com 0,8%)



respondem pelos 2% restantes, colhendo, respectivamente, 4,3 mil toneladas em 399 ha e 9,1 mil toneladas em 370 ha (IBGE, 2008).

### **Cultivares e híbridos comerciais**

Dos problemas relacionados à cultura do mamoeiro no Brasil deve ser ressaltada a limitação de alternativas quando da escolha para o plantio de cultivares e/ou híbridos comerciais que atendam às exigências dos mercados interno e externo.

As variedades de mamão mais exploradas no Brasil são classificadas em dois grupos, o Solo e o Formosa. As variedades do grupo Solo são representadas por linhagens, enquanto as variedades do grupo Formosa correspondem a híbridos  $F_1$ .

As plantas do grupo Solo produzem frutos de polpa avermelhada, de tamanho pequeno (300 a 650 g), sendo preferidos para exportação. As principais variedades do grupo Solo cultivadas no Brasil são a Sunrise Solo e Golden, além de existirem outras menos cultivadas atualmente, a exemplo da 'Improved Sunrise Solo 72/12' e 'Baixinho-de-Santa-Amália'. Por sua vez, os genótipos do grupo Formosa apresentam frutos de tamanho médio (1000 a 1300 g), com polpa avermelhada, tendo como principais materiais comerciais no Brasil o 'Tainung nº 1' e 'Calimosa'.

De acordo com Dantas (2000), a cultura do mamoeiro sustenta-se em uma base genética estreita, limitando o número de cultivares plantadas nas principais regiões produtoras. De modo geral, conforme o tipo de fruto, as cultivares pertencentes ao grupo Solo são as mais cultivadas no mundo. Ainda segundo esse autor, as variedades do grupo Formosa são mais adequadas à comercialização no mercado interno, enquanto que as do grupo Solo são comercializadas em ambos.

A cultivar mais plantada, Sunrise Solo, tem o seu rendimento limitado de 40 a 60 t.ha<sup>-1</sup>, sendo bastante suscetível ao vírus do mosaico, com frutos comumente apresentando sintomas da mancha fisiológica, além da polpa ser pouco consistente para a exportação (MARTINS; COSTA, 2003). Antes da introdução do mamoeiro do grupo Solo, praticamente não existiam cultivares comerciais para plantio, pois as sementes utilizadas apresentavam elevado grau de segregação devido à exclusiva existência de cultivares dióicas (MARIN, 2001).

Nesse contexto, vale ressaltar que a cultivar Golden, uma mutação da 'Improved Sunrise Solo Line 72/12', encontra-se bastante difundida nas regiões Norte do Espírito Santo e Sul da Bahia, com boa aceitação no mercado internacional, embora apresente menor teor de sólidos solúveis totais nos frutos e uma produtividade média inferior à 'Sunrise Solo'. (A CULTURA DO MAMÃO, 2009).

O grupo Formosa abrange híbridos  $F_1$  desenvolvidos pela Estação Experimental de Fengshan, como o Tainung n° 1 e Tainung n° 2, além de cultivares selecionadas pela Estação Experimental de Fruticultura Tropical da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), como Tailândia, JS11 e JS12 (FARIAS et al., 1998). O 'Tainung n° 1', dentre os materiais deste grupo, é o mais amplamente cultivado no Brasil, e apresenta uma produtividade média anual de 75,5 a 100,4 t.ha<sup>-1</sup> (MENDES et al., 1996).

Aliado à estreita base genética e à dificuldade de obtenção de sementes de alta qualidade, o desenvolvimento da cultura tem sido limitado principalmente por fatores relacionados a problemas fitossanitários de naturezas diversas. No caso específico das sementes, mesmo o elevado grau de autopolinização das variedades do grupo Solo não garante a qualidade e a pureza das sementes, que devem ser obtidas mediante polinizações controladas. O uso de sementes provenientes de frutos com polinização aberta pode levar à perda da identidade genética, baixa qualidade de frutos, sabor variável, elevados índices de esterilidade feminina, pentandria e carpeloidia (COSTA; PACOVA, 2003). No caso do grupo Formosa, em que são utilizados híbridos comerciais, o problema pode ser ainda maior, pois o alto custo da semente faz com que os produtores utilizem as próprias sementes dos híbridos  $F_1$  nas gerações  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$  etc. Nesse caso, as plantas perdem as características do híbrido original, produzindo frutos com qualidade inferior e totalmente fora do padrão comercial (COSTA; PACOVA, 2003).

### **Melhoramento genético do mamoeiro**

Segundo Pereira e Pereira (2006), normalmente ao se iniciar um programa de melhoramento genético de determinada cultura, é necessário conhecer a diversidade genética existente para melhor explorar essas diferenças genéticas. Nesse sentido, Storey (1953) relata que existe uma grande diversidade de tipos

de mamoeiro no mundo, com características desejáveis em um programa de melhoramento. Contudo, existem poucas linhagens realmente melhoradas ou mesmo consideradas como variedades definidas, em função da propagação de plantas por sementes, durante sucessivas gerações, sem o devido controle das polinizações.

A caracterização molecular contribui para a detecção da variabilidade genética existente e alocação de genótipos em grupos heteróticos, possibilitando maior ganho genéticos por seleção, visto que promove o direcionamento de cruzamentos entre genitores divergentes.

Em 1995, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em parceria com a empresa Caliman Agrícola S/A, deu início a um programa de melhoramento para mamoeiro e em 2002 surgiram os primeiros resultados: nove híbridos de mamoeiro foram registrados (PEREIRA, 2003), o que representou uma economia de aproximadamente dois milhões de dólares por ano, valor este gasto na importação de sementes do híbrido Tainung nº 1, de Taiwan. Estes híbridos têm se mostrado superiores ao 'Tainung nº 1' quanto às características do fruto: melhor sabor, maior teor de sólidos solúveis (mais doces), melhor coloração de polpa e maior uniformidade de frutos, atingindo melhor proporção de frutos exportáveis. Além disso, têm apresentado produtividade semelhante ao material importado (PEREIRA, 2003). Em 2003, como uma alternativa para o cultivo do mamoeiro no país, esta parceria produziu também o primeiro híbrido nacional do grupo 'Formosa' ('UENF/Caliman 01'), popularmente conhecido como Calimosa (UENF, 2003).

Vislumbrando o grande potencial do mercado de híbridos, a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical iniciou em 1995, a autofecundação de alguns acessos disponíveis no Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão), objetivando a formação de um banco de linhagens. Visto que as características desejáveis para cultura do mamoeiro não estão reunidas em um único genótipo, atualmente existe uma série de linhagens do grupo Solo e do grupo Formosa, com diferentes gerações de autofecundação, que estão sendo utilizadas em cruzamentos dialélicos para obtenção de híbridos. Em adição, além dessas linhagens, diversos híbridos já sintetizados encontram-se sob avaliação em diferentes ecossistemas. Cruz e Regazzi (1997) sugerem que estudos de capacidade combinatória, por meio de cruzamentos dialélicos, podem contribuir

substancialmente para o sucesso dos programas de melhoramento genético vegetal, por possibilitar tanto a identificação de progenitores para hibridação e de híbridos com qualidades superiores quanto auxiliar na identificação do método de seleção mais apropriado, por permitir que parâmetros genéticos sejam conhecidos *a priori*.

Além disso, o grupo de pesquisa da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical vêm utilizando a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) na identificação de linhagens de mamoeiro previamente selecionadas por apresentarem alto potencial agrônomo em relação a características produtivas e de qualidade de frutos. Oliveira et al. (2010a), ao analisarem 83 linhagens de mamoeiro por meio do uso de seleção assistida por marcadores microssatélites, identificaram novas linhagens com alto nível de endogamia e ampla diversidade genética. O uso de marcadores microssatélites na SAM pode permitir a identificação precoce de plantas com alto nível de homoziguidade em progênies segregantes e em acessos de germoplasma.

### **Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão)**

Mediante expedições de coletas realizadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMF), em parceria com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em 1995 teve início na Embrapa a formação do BAG-Mamão, contendo acessos de *Carica* spp. e demais gêneros da família Caricaceae.

Este BAG encontra-se instalado em área da sede da Embrapa Mandioca Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas, BA, possuindo cinco espécies (*C. papaya*, *V. cauliflora*, *V. quercifolia*, *V. monoica* e *J. spinosa*) compreendidas em 224 acessos de *C. papaya*, dois acessos de *V. cauliflora*, três acessos de *V. quercifolia*, dois acessos de *V. monoica* e dez acessos de *J. spinosa*. A conservação dos acessos é feita por meio do armazenamento de sementes a 4°C, em geladeira; por outro lado, sob condições de campo é feita por polinização controlada, por meio de autofecundação dos acessos hermafroditas e por cruzamento entre genótipos do mesmo acesso, no caso de acessos dióicos.

Atualmente, existem aproximadamente 30 coleções de *Carica* spp. em todo o mundo, contribuindo para a conservação dos recursos genéticos do mamoeiro. Dentre outros objetivos, esses recursos genéticos têm sido usados nos

programas de melhoramento visando a introgressão de genes de interesse nas variedades comerciais (como no caso da resistência a doenças do gênero *Vasconcellea*), para ampliar a variabilidade intra e interespecífica, o que certamente contribuirá para a sustentabilidade da cultura do mamoeiro, preservação da variabilidade genética existente na família *Caricaceae* e redução da vulnerabilidade do gênero *Carica*, em particular (DANTAS et al., 1999).

### **Caracterização morfológica x molecular**

Todo programa de melhoramento de plantas tem como objetivo principal reunir em um genótipo as características desejáveis, de interesse comercial. Entretanto, os caracteres de interesse, na sua grande maioria, são controlados por muitos genes, apresentam baixa herdabilidade e alta influência ambiental prejudicando o êxito dos programas de melhoramento (FERREIRA, 2003).

Segundo Dantas e Oliveira (2009), o desenvolvimento de variedades / híbridos com boas características agronômicas em termos de produtividade, frutificação precoce, porte baixo, baixa taxa de flores estéreis, carpelóides ou pentândricas, com frutos de qualidade, alto brix, casca fina, ausência de manchas, resistência ao armazenamento e transporte, pequena cavidade interna, cavidade interna em forma de estrela, dentre outros, é um grande desafio para os melhoristas da cultura, haja vista que essas características não estão reunidas em um único genótipo. Para Cattaneo (2003), a sustentabilidade da cultura do mamoeiro depende basicamente de novos genótipos com características agronômicas superiores, frutos que atendam as exigências dos consumidores, dos mercados interno e externo, com maior longevidade pós- colheita, e que apresentem resistência às principais pragas e doenças que atacam a cultura.

Até meados dos anos 60, a identificação das características de interesse era estabelecida basicamente por marcadores morfológicos baseados em caracteres fenotípicos. Estes marcadores apesar de apresentarem como desvantagens um número restringido de plantas utilizadas como modelo para os programas e de serem facilmente influenciados pelo ambiente, deram uma grande contribuição para o desenvolvimento teórico das análises de ligação gênica e para construção dos primeiros mapas genéticos.

Com o avanço da genética molecular, surgiram os marcadores moleculares permitindo a identificação direta dos genótipos, possibilitando determinar as

frequências gênicas, conseqüentemente a variabilidade genética das populações, o tipo de ação gênica predominante no controle de caracteres, além de superar a maior parte das limitações das análises fenotípicas.

### **Marcadores moleculares**

Dentre as principais aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas tem-se a caracterização de acessos de germoplasma e variedades, estudos de diversidade genética devido à grande quantidade de informações geradas, seleção assistida, construção de mapas genéticos, mapeamento de características quantitativas, enfim todas as atividades relacionadas ao melhoramento de plantas.

Diversos marcadores moleculares estão disponíveis atualmente, com destaque para os marcadores microssatélites, que são marcadores codominantes, ou seja, permitem que ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto sejam visualizados. Além disso, o que distingue este marcador dos demais é a sua natureza multi-alélica numa população, onde potencialmente todos os alelos de um determinado loco podem ser detectados e discriminados. Possuem alta reprodutibilidade, com grande abundância e ampla distribuição no genoma. O alto grau de polimorfismo se deve ao número de vezes que estas seqüências se repetem, gerando polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos amplificados por iniciadores específicos para as regiões que flanqueiam estas repetições (SERAFIM et al., 2002). No entanto, para sua utilização é necessário o desenvolvimento prévio de seqüências (iniciadores) específicas para a espécie a ser trabalhada (OLIVEIRA et al., 2008).

Todas essas características reunidas contribuem para que os microssatélites sejam marcadores ideais para o mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações, além de permitir a obtenção de informações entre diferentes locos, tornando possível a avaliação do nível de polimorfismo de uma população (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Serafim et al. (2002) salientam que as aplicações dos marcadores microssatélites se estendem ainda à identificação de cultivares, reconstituição de pedigrees, identificação de duplicatas e "fingerprint".

Os marcadores microssatélites têm sido amplamente aplicados para caracterização e avaliação de germoplasma de diversas espécies. Creste et al., (2001) utilizaram este marcador para caracterizar o germoplasma de espécies do gênero *Musa*, pelo fato de sua natureza codominante e multi-alélica permitir a detecção do nível de ploidia dentro e entre as espécies, contribuindo para a caracterização dos recursos genéticos existentes.

Sharon et al. (1992) utilizaram análise de microssatélites e minissatélites em trabalhos de análise genética e de identificação e caracterização entre e dentro de espécies de *Carica*. Os resultados mostraram que esta técnica foi uma ferramenta útil na identificação de espécies e de cultivares, podendo ser usada também na identificação de híbridos específicos e interespecíficos. Parasnis et al. (1999) empregaram sondas de microssatélites e de minissatélites altamente informativa para identificar diferenças sexo-específica em papaya. Segundo eles, somente a sonda de microssatélite (GATA)<sub>4</sub> demonstrou diferenças sexo-específica em todas as cultivares analisadas, identificando o sexo masculino. O diagnóstico potencial desses marcadores microssatélites foi explorado para determinação do sexo de plantas de mamoeiro ainda no estágio inicial de desenvolvimento. Santos et al. (2003), também utilizando marcadores microssatélites, selecionaram 20 plantas hermafroditas e 20 femininas das cultivares Sunrise Solo, Improved Sunrise Solo cv.72/12 e Baixinho de Santa Amália em áreas experimentais das Fazendas de Ensino e Pesquisa da UNESP / Campus de Ilha Solteira e Jaboticabal para analisar a eficiência da autofecundação e a frequência dos sexos nas progênies. Serafim et al. (2002), em seu programa de melhoramento genético de videira, utilizaram os marcadores microssatélites para obter proteção intelectual e aferição da identidade genotípica de algumas cultivares de uva. Com esse estudo foi possível confirmar a identidade genotípica de duas cultivares, permitindo a padronização da nomenclatura das mesmas. Além disso, foi criado o perfil molecular da cultivar BRS Cora, sendo possível distingui-la das demais e rastrear a identidade genética da cultivar, certificar mudas e garantir a propriedade intelectual do material.

Faleiro et al. (2004) realizaram um estudo da variabilidade genética do cacauero, utilizando marcadores microssatélites para avaliar a diversidade genética em 30 acessos de *Theobroma cacao*, selecionados para resistência à vassoura-de-bruxa. Os resultados mostraram que os marcadores microssatélites

são ferramentas confiáveis para estudo de divergência genética, pois disponibilizam para os pesquisadores dados claros, de fácil distinção e interpretação, além de serem reproduzíveis.

Outra aplicação dos marcadores microssatélites, amplamente verificado na literatura, tem sido o estudo da estrutura de populações. Gao et al. (2002) verificaram que os microssatélites apresentaram nível muito alto de diversidade genética na avaliação da estrutura genética de populações de arroz, quando comparados com aloenzimas. Além disso, os microssatélites foram mais eficientes do que as aloenzimas em detectar a diferenciação genética na população estudada. Com esses resultados os autores puderam sugerir que os marcadores microssatélites são uma ferramenta poderosa e de alta resolução para avaliação de características importantes da biologia de populações.

Segundo Oliveira et al. (2008), apesar do avanço das pesquisas nas áreas de biologia molecular e genômica, existem poucos relatos sobre o desenvolvimento de microssatélites para o mamoeiro. Santos et al. (2003) obtiveram 32 locos de microssatélites com o uso de bibliotecas genômicas enriquecidas. Contudo, esses microssatélites não apresentaram polimorfismo nos acessos de mamoeiros analisados. Baseado nesta mesma metodologia, Pérez et al (2006) desenvolveram 45 microssatélites, dos quais 24 se mostraram polimórficos em acessos de *Carica papaya*.

Apesar disto, o número de sequências disponíveis de microssatélites ainda é insuficiente para permitir maiores avanços na conservação, uso e valoração dos recursos genéticos e, sobretudo, no melhoramento do mamoeiro (OLIVEIRA et al., 2008).

Atualmente, os marcadores microssatélites na cultura do mamoeiro vêm sendo utilizados para predição do sexo, identificação de microssatélites por meio da exploração do banco de dados de DNA, estudo de seleção assistida e identificação de polimorfismo (OLIVEIRA et al., 2007, 2008, 2010a, 2010b).

Após essa introdução geral sobre a cultura do mamoeiro, enfocando aspectos diversos, serão apresentados a seguir dois trabalhos que abordam a importância dos marcadores microssatélites no aspecto molecular do melhoramento genético do mamoeiro e na estruturação da diversidade genética.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**A CULTURA DO MAMÃO.** Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 3. ed. rev. ampl. - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 119p. (Coleção Plantar, 65).

ANDREANI JR., R. **Caracterização do sexo do mamoeiro (*Carica papaya* L.) através de marcadores moleculares e de microscopia eletrônica de varredura.** 1998, 65f. Tese (Doutorado), FCAV-UNASP, Jaboticabal, SP, 1998.

ARKLE JR., T.D.; NAKASONE, H. Y. Floral differentiation in the hermaphroditic papaya. **HortScience**, v.19, n.6, p. 832-834, 1984.

BADILLO, V.M. **Monografía de la familia Caricaceae.** Maracay, Venezuela, 1971, 221f. Tese, Universidad Central de Venezuela, 1971.

BADILLO, V.M. Caricaceae. **Revista de la Facultad de Agronomía-Alcance**, v.43, 1993. 111p.

BADILLO, V.M. ***Carica* L. vs *Vasconcellea* St.Hil. (Caricaceae):** con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, p. 74-79, 2000.

BADILLO, V.M. **Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hil. y no *Vasconcellea* (Caricaceae).** *Ernstia*, p. 75-76, 2001.

BRAPEX. **Exportação de mamão.** Disponível em: <[http://www.brapex.net/index\\_1024.asp](http://www.brapex.net/index_1024.asp)> Acesso em 10 set. 2009.

CATTANEO, L.F. Melhoramento genético do mamoeiro assistido por marcadores moleculares. In: SIMPOSIO PAPAYA BRASIL 2., 2003, Linhares - ES. **Anais...** Linhares - ES: INCAPER. 2003. Cap. 12, p. 191-208.

COSTA, A.F.S.; PACOVA, B.E.V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D.S.; COSTA, A.F.S. **A cultura do mamão: tecnologia e produção.** Vitória-ES: INCAPER, 2003. Cap. 3, p. 59-102.

COUTO, F.A.D.; NACIF, S.R. Hibridação em mamão. In: BORÉM. A. (Org). **Hibridação artificial de plantas.** Viçosa. MG: UFV, 1999. p. 307-329.

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.

CRUZ, C.D., REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Editora UFV, Viçosa. 1997, 390p.

DANTAS, J.L.L. et al. Variabilidade genética e melhoramento do mamoeiro. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Org.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro** (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>.

DANTAS, J.L.L. Introdução. In: TRINDADE, A.V. **Mamão, Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000, p. 9.

DANTAS, J.L.L.; CASTRO NETO, M.T. Aspectos botânicos e fisiológicos. In: TRINDADE, A.V. (Org.). **Mamão, Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000, p. 11-14.

DANTAS, J.L.L.; OLIVEIRA, E.J. de. O melhoramento genético do mamoeiro: avanços, desafios e perspectivas. In: SIMPÓSIO NORDESTINO DE GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2009, Fortaleza. **Anais...** Melhoramento genético no contexto atual: Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; SBMP-Regional Ceará, 2009. p. 151-180.

DREW R.A; O'BRIEN C.M; MAGDALITA P.M. Development of interspecific *Carica* hybrids. **Acta Horticulturae**, v.461, p. 285-292, 1998.

FALEIRO, A.S.G. et al. Variability in cacao selected by producers for resistance to witches broom based on microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p. 290-297, 2004.

FARIAS, A.R.N. et al. **A cultura do mamão**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. (Coleção Plantar, v.37).

FERREIRA, M.A.J.F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2003. 63p. (Documentos, 1).

FERREIRA, M.E.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília - DF: Embrapa - Cenargen. 1998, 220p.

GAO, L.Z. et al. Assessment of population genetic structure in common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. using microsatellite and allozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, n.1, p. 173-180, 2002.

HOFMEYR, J.D.J. Genetical studies of *Carica papaya* L. African Department of Agriculture for Science, 1938. **Bulletin**, v.187, p. 1-46, 1938.

HOFMEYR, J.D.J. Sex reversal in *Carica papaya* L. **South African Journal Science**, v.36, p. 286-287, 1939.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola brasileira**. 2006. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 10 set. 2009.

IBGE. **Sidra banco de dados agregados**. 2008. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 06 maio 2010.

IBRAF. **Comparativo das exportações brasileiras de frutas frescas**. 2008. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em 06 maio 2010.

KYNDT, T. et al. Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v.37, p. 442-459, 2005.

MARIN, S.L.D. **Melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.): habilidade combinatória de genótipos dos grupos 'Solo' e 'Formosa'**. 2001. 117f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2001.

MARTINS, D.S.; COSTA, A.F.S. **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória-ES. INCAPER. 2003. 497p.

MEDINA, V.M.; CORDEIRO, Z.J.M. **Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI. 1994. 52p.

MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas, BA. EAUFBA/EMBRAPA-CNPMF, 1996. 176p.

NAKASONE, H.Y. Melhoramento de mamão no Havaí. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MAMÃO, 1., 1980. Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal, SP: FCAV/UNESP, 1980. p. 275-287.

NAKASONE, H.Y.; PAULL, R.E. **Tropical fruits: crop production science in horticulture**. New York: Cab International. 1998, 445p.

OLIVEIRA, E.J. et al. Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.12, p. 1747-1754, 2007.

OLIVEIRA, E.J. et al. Identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio de exploração do banco de dados de DNA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.3, p. 841-845, 2008.

OLIVEIRA, E.J. et al. Polymorphism microsatellite markers set for *Carica papaya* L. and its use in molecular-assisted selection. **Euphytica**, v.173, p. 279-287, 2010a.

OLIVEIRA, E.J. et al. Polymorphism of microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.28, p.519-530, 2010b.

OLSON, M.E. Intergeneric relationships within the Caricaceae - Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. **International Journal of Plant Sciences**, University of Chicago, v.163, n.1, p. 51-63, 2002.

PARASNIS, A.S.; RAMAKRISHNA, W.; CHOWDARI, K.V. Microsatellite (GATA) in reveals sex-specific differences in papaya. **Theoretical Applied Genetics**, v.99, p. 1047-1052, 1999.

PEREIRA, M.G. Melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya*): desenvolvimento e recomendação de híbridos. **Seahortes**, v.1, n.1, p. 73-77, 2003.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S. Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas. In: BORÉM, A.E.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 85-106.

PÉREZ, J.O. et al. Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, n.1, p. 212-217, 2006.

SANTOS, S.C.; et al. A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p. 263-267, 2003.

SERAFIM, D.C.S. et al. Melhoramento genético da videira na Embrapa uva e vinho: utilização de marcadores microssatélites para proteção intelectual e aferição da identidade genotípica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém, PA, 2002.

SHARON, D. et al. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of *Carica papaya* L. and other *Carica* species. **Euphytica**, v.62, p. 119-126, 1992.

STOREY, W.B. The botany and sex relationships of the papaya. In: \_\_\_\_\_. **Papaya production in the Hawaiian Island**. Hawaii: University of Hawaii; Hawaii Agricultural Experiment Station, 1941. Part I, p. 5-22. (Technical Bulletin 87).

STOREY, W.B. Genetics of the papaya. **Journal of Heredity**, v.44, p. 70-78, 1953.

UENF. Pesquisa na UENF permitirá ao país a economia de US\$ 2 milhões por ano. **Jornal da Ciência**, v.2280, 19 de maio 2003.

## **CAPÍTULO 1**

### **USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE MAMOEIRO<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo submetido ao Comitê Editorial do Periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira

## USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE MAMOEIRO

RESUMO: A cultura do mamoeiro tem papel de destaque na fruticultura mundial. No Brasil, os Estados da Bahia e Espírito Santo se destacam como os maiores produtores. Porém, mesmo apresentando elevado potencial de cultivo, alguns fatores têm limitado o aumento da produção, entre eles: problemas relacionados com pragas, doenças, características agrônômicas indesejáveis e, principalmente, reduzida disponibilidade de material melhorado para exploração comercial devido à estreita base genética das variedades cultivadas. Nesse contexto, os marcadores moleculares têm sido ferramentas importantes na caracterização molecular de acessos de mamoeiro com potencial para uso nos programas de melhoramento visando incremento de variabilidade nos genótipos melhorados. Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar marcadores microssatélites na caracterização de acessos de mamoeiro e posterior avaliação do seu potencial de uso na detecção de variação genética. Para isso, foram utilizados 96 acessos de germoplasma de mamoeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF) e 15 iniciadores de microssatélites. Os dados moleculares foram usados para estimar as frequências alélicas, a heterozigosidade, o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e o coeficiente de endogamia (F). Os 15 pares de iniciadores amplificaram 68 alelos. A média do número de alelos por loco ( $N_A$ ) foi 4,5. Os valores de PIC variaram entre 0,189 a 0,691, sendo o maior valor encontrado para o iniciador CP16. Para todos os locos de microssatélites selecionados a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) foi menor que a esperada ( $H_E$ ). O alto índice médio de endogamia estimado (0,672) e o excesso de homozigotos detectados, indicam a possível existência de endogamia entre os acessos analisados, decorrente de autofecundação ou de cruzamento entre indivíduos aparentados. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o sucesso dos marcadores moleculares microssatélites para estudos genéticos em *Carica papaya* L., além de possibilitar a definição de novas estratégias de conservação do germoplasma de mamoeiro.

**Palavras-chave:** *Carica papaya* L., germoplasma, marcadores moleculares.

## USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PAPAYA ACCESSIONS

**ABSTRACT:** The papaya crop has an important role in the world's fruticulture. In Brazil, the states of Bahia and Espírito Santo stand out as major producers. However, even with high potential for cultivation some factors have limited the yield, including: problems related to pests, diseases and undesirable agronomic traits, and especially low availability of improved material for commercial use due to the narrow genetic base of the cultivars. In this context, molecular markers have been important tools in molecular characterization of papaya accessions with potential for use in breeding programs for increased variability in genotypes. Therefore, the main objective of this study was the molecular characterization of papaya accessions using microsatellites markers and further evaluation of their potential use to detect genetic variability. A total of 96 papaya accessions from the Papaya Active Germplasm Bank (Papaya-AGB) of Embrapa Cassava and Tropical Fruits (CNPMPF) and 15 microsatellite primer pairs were used. The molecular data were used to estimate allele frequencies, heterozygosity, polymorphism information content (PIC) and inbreeding index. The 15 microsatellite primer pairs amplified 68 alleles. The mean number of alleles per locus (NA) was 4.5. The PIC values ranged from 0.189 to 0.691, with the highest value found for primer CP16. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) was lower than the expected heterozygosity ( $H_e$ ), for all selected microsatellites loci. The high estimate of inbreeding index (0.672) and excess of homozygotes indicate the possible existence of inbreeding among the accessions analyzed. This was due to selfing or crosses between related individuals. These results demonstrate the success of microsatellite markers for genetic studies in *Carica papaya* L. and additionally points out to the development of new strategies for papaya germplasm conservation.

**Keywords:** *Carica papaya* L., germplasm, molecular markers.

## **INTRODUÇÃO**

Dentre os problemas relacionados com a cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.) deve ser ressaltada a estreita base genética dos genótipos comerciais. No Brasil, seu cultivo concentra-se na exploração de variedades provenientes de dois grupos, Solo e Formosa.

A ampliação da base genética do mamoeiro mediante o uso de novos acessos de germoplasma é uma estratégia de sucesso. Entretanto, para isso, é preciso promover a caracterização e avaliação dos recursos genéticos existentes (caracterização fenotípica e molecular, notadamente). Esta ação é de fundamental importância para o conhecimento da diversidade genética na cultura, essencial para o planejamento de estratégias de melhoramento e conservação de germoplasma, como o desenvolvimento de linhagens, variedades ou híbridos melhorados com características de interesse como a produtividade e qualidade de frutos, essenciais para o sucesso na adoção de cultivares de mamoeiro visando atendimento das demandas internas e externas, a síntese de cultivares resistentes / tolerantes a doenças de grande importância, além de possibilitar a introgressão de novos genes de interesse em variedades cultivadas, liberando uma ampla variabilidade genética nas gerações subsequentes (SIQUEIRA et al., 1988).

A caracterização molecular permite a discriminação de acessos provenientes de bancos ou coleções de germoplasma, a identificação de duplicações e a prospecção da variabilidade intrínseca ou entre acessos de uma mesma espécie. Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados como alternativa para o acesso a esse conhecimento, pois apresentam ampla capacidade de amostragem do genoma (SILVIA et al., 2006).

Dentre as principais aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas tem-se a caracterização de acessos de germoplasma e variedades, estudos de diversidade genética devido à grande



quantidade de informações geradas, seleção assistida, construção de mapas genéticos e mapeamento de características quantitativas.

Atualmente existem diversos marcadores moleculares disponíveis merecendo destaque os marcadores microssatélites ou SSR (*Single Simple Repeat*) por possuírem herança co-dominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados. Além disso, o que distingue este marcador dos demais é a sua natureza multi-alélica numa população, onde potencialmente todos os alelos de um determinado loco podem ser detectados e discriminados. Possuem alta reprodutibilidade, com grande abundância e ampla distribuição no genoma. O alto grau de polimorfismo se deve ao número de vezes que estas seqüências se repetem, gerando polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos amplificados por iniciadores específicos para as regiões que flanqueiam estas repetições (SERAFIM et al., 2002).

O primeiro estudo foi feito por Tan e Weinheimer (1976), ao estimar a diversidade genética da espécie utilizando isoenzimas. As relações genéticas entre mamão e espécies selvagens foram investigadas por Droogenbroeck et al. (2002), utilizando AFLP e por Olson (2002), enquanto que Lemos et al. (2002) pesquisaram a identificação do sexo por meio de RAPD.

Segundo Oliveira et al. (2008), apesar do avanço das pesquisas nas áreas de biologia molecular e genômica, existem poucos relatos sobre o desenvolvimento de microssatélites para o mamoeiro. Santos et al. (2003) obtiveram 32 locos de microssatélites com o uso de bibliotecas genômicas enriquecidas. Contudo, esses microssatélites não apresentaram polimorfismo nos acessos de mamoeiros analisados. Baseado nesta mesma metodologia, Pérez et al. (2006) desenvolveram 45 microssatélites, dos quais 24 se mostraram polimórficos em acessos de *Carica papaya* L. Atualmente, os marcadores microssatélites na cultura do mamoeiro vêm sendo utilizados para predição do sexo, identificação de microssatélites por meio da exploração do banco de dados de DNA, estudo de seleção assistida e identificação de polimorfismo (OLIVEIRA et al. 2007, 2008, 2010a, 2010b).

Neste contexto, este trabalho objetivou a caracterização molecular de 96 acessos da coleção de germoplasma de mamoeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, utilizando-se os marcadores microssatélites como ferramenta auxiliar ao estudo da variabilidade genética.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material genético**

Foram avaliados 96 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF) (Tabela 1), utilizando 15 marcadores microssatélites (Tabela 2), desenvolvidos por Oliveira et al. (2008), previamente selecionados com base no polimorfismo encontrado. Todas as análises foram conduzidas no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular (LVBM), da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), em Cruz das Almas - Bahia.

Tabela 1. Acessos de mamoeiro pertencentes ao Banco de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), com suas respectivas espécies, procedência e origem. Cruz das Almas - BA, 2010.

N°	Acessos	Espécie	Procedência	Origem
1	CMF002	<i>Carica papaya</i> L.	Cenargen	Costa Rica
2	CMF003	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Taiwan
3	CMF005	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	
4	CMF006	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Havaí
5	CMF007	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
6	CMF008	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
7	CMF010	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
8	CMF011	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Costa Rica
9	CMF012	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
10	CMF014	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
11	CMF017	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Taiwan
12	CMF018	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Taiwan
13	CMF020	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasil
14	CMF021	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasil
15	CMF022	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
16	CMF023	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
17	CMF024	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Costa Rica
18	CMF027	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	
19	CMF028	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Costa Rica
20	CMF029	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	
21	CMF031	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Costa Rica
22	CMF032	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Costa Rica
23	CMF034	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	

24	CMF037	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	
25	CMF38	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
26	CMF39	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
27	CMF040	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
28	CMF041	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
29	CMF043	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
30	CMF044	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
31	CMF045	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
32	CMF046	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
33	CMF047	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Cruz das Almas – Brasil
34	CMF049	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Cruz das Almas – Brasil
35	CMF054	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Havaí
36	CMF055	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
37	CMF056	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
38	CMF058	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
39	CMF065	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
40	CMF066	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	
41	CMF067	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
42	CMF068	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
43	CMF069	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Cruz das Almas – Brasil
44	CMF070	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
45	CMF074	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida – Brasil
46	CMF078	<i>C. papaya</i> L.	Faz. S. Silv. Linhares	Brasil
47	CMF079	<i>C. papaya</i> L.	IAC - Campinas	Brasil
48	CMF080	<i>C. papaya</i> L.	Cruz das Almas	Havaí
49	CMF081	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	
50	CMF082	<i>C. papaya</i> L.	Universidade de Natal	África do Sul
51	CMF087	<i>C. papaya</i> L.	Havaí	

Continuação

52	CMF088	<i>C. papaya</i> L.	Havaí (Hilo)	
53	CMF092	<i>C. papaya</i> L.	Havaí (Hilo)	
54	CMF094	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Carazinhos – RS
55	CMF097	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Minas Gerais
56	CMF102	<i>C. papaya</i> L.	Cruz das Almas	Cruz das Almas – Brasil
57	CMF104	<i>C. papaya</i> L.	Namíbia	África do Sul
58	CMF105	<i>C. papaya</i> L.	CPATC	
59	CMF107	<i>C. papaya</i> L.	CPATC	Umbaúba – SE
60	CMF108	<i>C. papaya</i> L.		África do Sul
61	CMF114	<i>C. papaya</i> L.		África do Sul
62	CMF115	<i>C. papaya</i> L.		África do Sul
63	CMF118	<i>C. papaya</i> L.		Monte Santo
64	CMF123	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Tailândia
65	CMF125	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Gaia	Havaí
66	CMF128	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Gaia	Espírito Santo – ES
67	CMF129	<i>C. papaya</i> L.	Embrapa Amazônia	Manaus – AM
68	CMF154	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Guatemala
69	CMF157	<i>C. papaya</i> L.	Barra do Garças	Mato Grosso – Brasil
70	CMF165	<i>C. papaya</i> L.	Bela Vista	Mato Grosso do Sul – Brasil
71	CMF182	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
72	CMF188	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
73	CMF189	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
74	CMF191	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
75	CMF194	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
76	CMF195	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
77	CMF219	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
78	CMF223	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
79	CMF227	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF

Continuação

80	CMF228	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília – DF
81	CMF230	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Palmares	Porto Seguro – BA
82	CMF232	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Bello Fruit	Mucuri – BA
83	CMF233	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Gondo	Nova Viçosa – BA
84	CMF234	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda São Francisco	Teixeira de Freitas - BA
85	CMF235	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda São Francisco	Teixeira de Freitas - BA
86	CMF-L12-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
87	CMF-L30-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
88	CMF-L48-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
89	CMF-L62-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
90	CMF-L75-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
91	CMF-L88-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
92	CMF-L90-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
93	Golden	Variedade		Brasil
94	Sunrise	Variedade		Brasil
95	Tainung	Híbrido		Brasil
96	Calimosa	Híbrido		Brasil

CMF= Centro de Mandioca e Fruticultura; PMGM = Programa de Melhoramento Genético do Mamoeiro.

Tabela 2. Relação das seqüências e características de 15 pares de iniciadores de microssatélites selecionados para caracterização de 96 acessos do Banco de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF). Cruz das Almas - BA, 2010.

Loco	Forward	Reverse	Tm (°C)	Alelo (pb)	Motivos
CP02	AGGCGAAATCGGAAGAGAG	CTGGTAAAACGACGATGACG	59	144	(AGG) <sub>9</sub>
CP10	AAAATCACAGCACGTATGGTT	GAAATTACAAATGGGCAAAAAG	58	183	(TACA) <sub>4</sub> (TA) <sub>9</sub> (GA) <sub>10</sub>
CP16	TCAACTATTTCCCCGCATA	CACCTCCTTGTCCAAAGGTT	60	217	(AT) <sub>13</sub>
CP21	ATCGACCGAGGAAGGTACG	TCAAAAACCCATTGAGTCTGC	60	151	(GT) <sub>12</sub>
CP31	AAGGGTACGTCATGGAGCA	TCTGTCGCCTTTTATACTCTTG	57	153	(AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>10</sub>
CP44	TGACAACGAACTACATCCCTA	CCTCATGGTTTGTGTACTCCT	56	232	(AT) <sub>12</sub>
CP49	CCTGAAAGCAACCATTTCTA	TCGCTGGAGCTGTAAGAGA	56	201	(AT) <sub>12</sub>
CP52	GGAAAGATCATAGAAACAGTGG	TGCTATCTTGGTTGTCTCTCA	55	196	(AT) <sub>10</sub> (AG) <sub>12</sub>
CP61	GGAGTGATGTAAGTGCCTCAT	CATGAGCCCTACTCCGAAC	57	205	(AT) <sub>12</sub> + (AC) <sub>8</sub>
CP71	TCCCCAACCTCAAGAAGATAA	TTACACCACCATCGCCATC	59	250	(CT) <sub>14</sub>
CP80	GTGGCAATGAACTCGGCTA	ATCCTCCCTCCACCAACAG	59	219	(TC) <sub>12</sub>
CP94	TCGCAGAGAAAGAGAAAGCA	TCCTCTCACCAGTTATTGGAA	58	169	(AG) <sub>12</sub> at(AG) <sub>7</sub>
CP95	CAGTCCTTGCAGGCGATTA	CTCAACCATTTTTCTCACCA	60	183	(AG) <sub>6</sub> tg(AG) <sub>7</sub>
CP97	TTTCTGTTACCTCTCTCGGATT	GAGATGACAACCATACAGCAA	56	262	(TA) <sub>11</sub>
CP100	TGATCGCTTTCGCTTCACT	GATTTCACTGCCACGGACT	58	294	(GA) <sub>11</sub> + (AG) <sub>23</sub>

Tm = temperatura média

### **Extração do DNA genômico**

O DNA de cada acesso foi obtido de amostras foliares jovens, coletadas e armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em seguida foram maceradas em nitrogênio líquido empregando o método CTAB (Cethyltrimethylammonium Bromide, Sigma), proposto por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações descritas a seguir: De cada amostra foliar macerada, aproximadamente 300 mg de tecido foi transferido para tubos eppendorf com capacidade para 2,0 mL e acondicionados em nitrogênio líquido. Foram adicionados aos tubos 800  $\mu\text{L}$  do tampão de extração pré-aquecido contendo 10% CTAB; 5,0 M NaCl; 0,5 M EDTA; 1,0 M Tris-HCl (pH 8,0); 1% PVP e 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol, incubando-se a  $65^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos e homogenizando-se suavemente os tubos a cada 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 700-800  $\mu\text{L}$  de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1), invertendo-se os tubos, continuamente, até formar emulsão. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm por dez minutos, transferindo-se os sobrenadantes para novos tubos. Esse passo foi repetido mais uma vez e, após nova centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, adicionando-se 2/3 do volume coletado de álcool Isopropílico gelado, com suave inversão e incubação a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Após incubação, foi efetuada centrifugação por 10 min a 12.000 rpm, obtendo-se os péletes (precipitados), que foram secos em temperatura ambiente, ressuspensos em 600  $\mu\text{L}$  de solução Tris-EDTA (1,0M Tris-HCl pH8,0 e 0,5M EDTA), adicionados 200  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio a 7,5 M, e incubados no gelo por 15min. Na sequência, houve nova centrifugação por 10 min a 10.000 rpm, com transferência do sobrenadante para novos tubos de 1,5  $\mu\text{L}$ . Após esta etapa, adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, com incubação por 1 hora, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as suspensões foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições anteriores, lavando-se o precipitado com etanol 70% gelado, secando-se e, finalmente, ressuspendendo-se os péletes em 100  $\mu\text{L}$  de solução de TE + 1  $\mu\text{L}$  de RNase, acondicionando o DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas utilizando-se gel de agarose a 0,8%, comparando a intensidade da fluorescência das amostras coradas com brometo de etídio a uma série de concentrações de DNA fago  $\lambda$ . Em seguida, o DNA foi diluído para a concentração de trabalho de 10 ng/ $\mu\text{L}$  e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



### **Otimização e seleção de iniciadores**

Em uma primeira etapa foi realizada uma triagem, com otimização das condições de reação de 100 pares de iniciadores desenhados por Oliveira et al. (2008), utilizando 30 acessos selecionados com base em características morfológicas desejáveis, provenientes do BAG-Mamão (CMF008, CMF011, CMF017, CMF023, CMF024, CMF031, CMF038, CMF053, CMF067, CMF068, CMF082, CMF101, CMF102, CMF108, CMF115, CMF123, CMF125, CMF128, CMF129, CMF134, CMF135, CMF138, CMF142, CMF143, CMF147, CMF157, CMF165, CMF188, CMF189 e CMF191).

As amplificações para otimização da temperatura de anelamento e demais reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research), empregando-se o seguinte programa: ciclo inicial de 4 min a 94°C, seguido de 30 ciclos a 94°C por 50s, (temperatura de anelamento variando de 55 a 62°C, de acordo com o iniciador), por 50s, 1 min a 72°C e extensão final a 72°C por 7 min. Após a amplificação, 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 *Hoefler SQ3 Sequencer* (Pharmacia Biotech), enquanto aqueles com diferenças alélicas maiores de 10 pb foram separados em géis de agarose 1000 a 3%. O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb (New England Biolabs).

### **Genotipagem com marcadores microssatélites**

Após a obtenção do DNA, esses foram amplificados, em reações constando de um volume total de 15µL, contendo 30,0 ng de DNA genômico; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM Tris/KCl, 100µM de dNTPs; 0,3 mM de cada iniciador e uma Unidade de Taq polimerase. As amplificações foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research), empregando-se o seguinte programa: ciclo inicial de 4 min a 94°C, seguido de 30 ciclos a 94°C por 50s, (temperatura de anelamento variando de 55 a 62°C de acordo com o iniciador), por 50s, 1 min a 72°C e extensão final a 72°C por 7 min. O preparo dos géis, (Figuras 1 e 2), e a revelação seguiram os mesmos passos utilizados no item Otimização e seleção

de iniciadores. O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb (Biolabs).

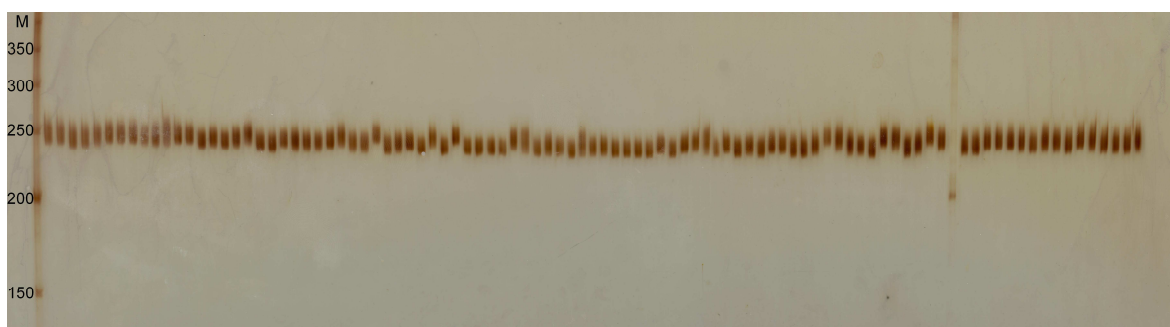


Figura 1. Produtos de amplificação de amostras de DNA gerados pelo iniciador CP71 em gel desnaturante de poliacrilamida. Cruz das Almas - BA, 2010.

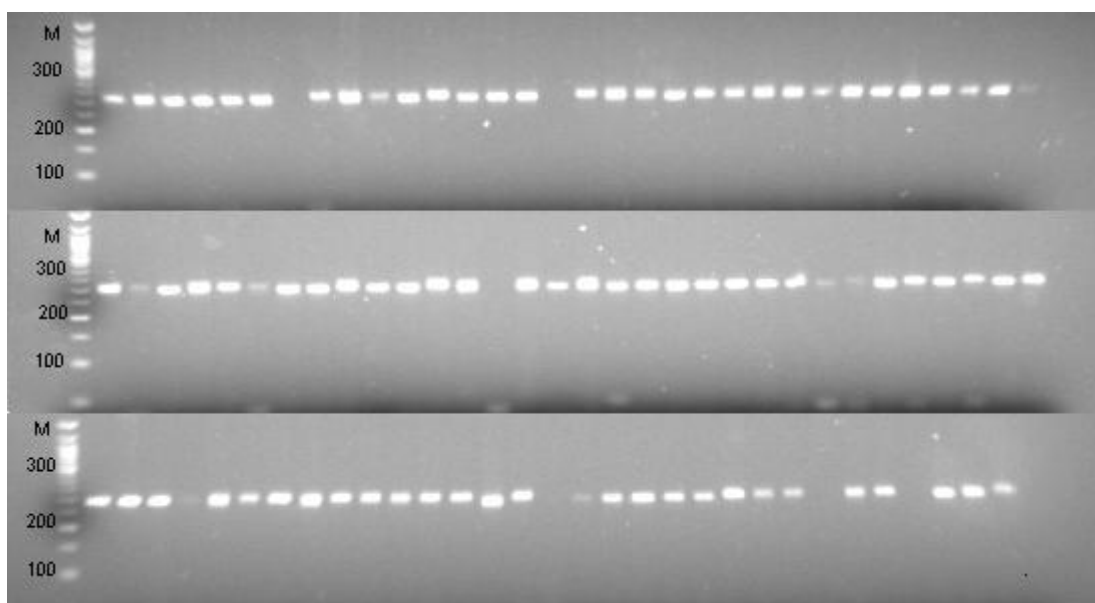


Figura 2. Produtos de amplificação de amostras de DNA gerados pelo iniciador CP100 em gel de agarose 1000. Cruz das Almas - BA, 2010.

### Análise dos dados moleculares

As estimativas que caracterizam os locos, como o número de alelos por loco ( $N_A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC - *Polymorphic information content*) e coeficiente de endogamia (F) foram obtidas com o auxílio do programa PowerMarker (LIU; MUSE, 2005).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises derivadas dos dados do programa PowerMarker versão 3.25 resultaram nos coeficientes resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Composição alélica (motivo), número de alelos por loco ( $N_A$ ), variação tamanho de pb, heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e coeficiente de endogamia (F) em 15 locos polimórficos selecionados de *Carica papaya* L. avaliados em 96 indivíduos. Cruz das Almas - BA, 2010.

Loco	Motivo do microssatélite	$N_A$	Tamanho (pb)	$H_E$	$H_o$	PIC	F
CP02	(AGG) <sub>9</sub>	3	190-200	0,403	0,242	0,368	0,403
CP10	(TACA) <sub>4</sub> (TA) <sub>9</sub> (GA) <sub>10</sub>	7	170-210	0,722	0,289	0,684	0,604
CP16	(AT) <sub>13</sub>	10	200-240	0,725	0,459	0,691	0,373
CP21	(GT) <sub>12</sub>	5	150-160	0,732	0,451	0,687	0,390
CP31	(AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>10</sub>	3	146-148	0,564	0,174	0,475	0,695
CP44	(AT) <sub>12</sub>	3	188-200	0,327	0,202	0,280	0,386
CP49	(AT) <sub>12</sub>	7	170-209	0,568	0,022	0,534	0,963
CP52	(AT) <sub>10</sub> (AG) <sub>12</sub>	3	194-197	0,539	0,094	0,480	0,827
CP61	(AT) <sub>12</sub> + (AC) <sub>8</sub>	3	200-207	0,322	0,122	0,284	0,626
CP71	(CT) <sub>14</sub>	5	242-255	0,622	0,000	0,566	1,000
CP80	(TC) <sub>12</sub>	3	218-222	0,206	0,000	0,189	1,000
CP94	(AG) <sub>12</sub> at(AG) <sub>7</sub>	5	145-170	0,662	0,099	0,613	0,852
CP95	(AG) <sub>6</sub> tg(AG) <sub>7</sub>	4	185-200	0,589	0,156	0,509	0,737
CP97	(TA) <sub>11</sub>	3	250-268	0,217	0,096	0,201	0,559
CP100	(GA) <sub>11</sub> + (AG) <sub>23</sub>	4	245-260	0,540	0,157	0,447	0,713
Média		4,53		0,516	0,171	0,467	0,672

O número de alelos variou de 3 a 10, com média de 4,5. Valores muito próximos foram encontrados por Ocampo Pérez et al. (2007), analisando 72 genótipos de mamão da região do Caribe, utilizando 15 marcadores microssatélites e por Oliveira et al. (2010b) que encontraram média de número de alelos por loco de 4,02, quando foram analisados 30 acessos de mamoeiro do BAG-Mamão e 18 variedades com 59 locos de microssatélites. Esse baixo número de alelos de microssatélites pode ser um indicativo da restrita variabilidade genética presente na espécie *Carica papaya* L. ou se deve ao número de acessos avaliados. Contudo, é possível destacar o loco CP16 com 10 alelos; os locos CP10 e CP49 com sete alelos e os CP21, CP71 e CP94 com 5 alelos por loco, como marcadores importantes nos estudos associados ao desenvolvimento de novas variedades de mamoeiro.

Esta mesma técnica de marcadores microssatélites foi utilizada por Bianchi et al. (2004) e mostrou-se eficiente em trabalho com pessegueiro e nectarineira, que apresentam baixa variabilidade genética. Os autores avaliaram a variabilidade genética dessas duas espécies utilizando 13 iniciadores, os quais apresentaram um total de 56 alelos, variando de três a sete por iniciador.

Mediante análise dos dados dispostos na Tabela 3, observa-se que o tamanho dos fragmentos amplificados variou de 145 a 268 pb. O PIC apresentou resultados variando entre 0,189 a 0,691. O maior valor de PIC encontrado foi para o loco CP16, que apresentou o maior número de alelos por loco (10), sendo considerado altamente informativo. Os locos CP80 e CP97 apresentaram valores de PIC inferiores a 0,25 e foram considerados pouco informativos. Já o CP95, com PIC de 0,509, foi considerado moderadamente informativo, em conformidade com a classificação apresentada por Botstein et al. (1980), que indica que os valores de PIC são agrupados em três níveis: altamente informativo ( $PIC > 0,5$ ); moderadamente informativo ( $0,25 < PIC < 0,5$ ) e pouco informativo ( $PIC < 0,25$ ).

Cumprir destacar que o PIC também fornece uma estimativa do poder discriminatório do loco, levando-se em conta não apenas o número de alelos que são expressos, mas também as frequências relativas destes alelos. Assim sendo, ainda de acordo com a classificação de PIC apresentada por Botstein et al. (1980), os valores revelados para o presente conjunto de dados mostram-se moderadamente informativos, quando se considera a média detectada (0,467).

Verificou-se que para todos os locos de microssatélites selecionados, a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) foi menor que a esperada ( $H_E$ ), ocorrendo uma variação de  $H_O$  entre 0,000 a 0,459 e 0,206 a 0,732 para  $H_E$ . As médias para  $H_O$  e  $H_E$  foram inferiores às encontradas por Oliveira et al. (2010b) ao analisar 59 locos microssatélites com 18 variedades e 30 acessos deste mesmo banco de germoplasma. Ocampo Pérez et al. (2006), ao utilizar 26 marcadores SSR polimórficos em *Carica papaya* L., encontraram valores médios de  $H_O$  superiores e valores médios detectados para  $H_E$  inferiores a este estudo.

Comparando-se as estimativas de  $H_O$  e  $H_E$  evidencia-se um déficit de heterozigotos na população, que pode ser explicado em função da existência de endogamia decorrente das autofecundações a que são submetidos os acessos no BAG-Mamão, sobretudo das populações ginóica-andromonóicas. Vale salientar que os acessos do BAG-Mamão são mantidos sob condições de campo mediante a autofecundação de plantas hermafroditas ou cruzamentos (“sib-crossing”), no caso de cruzamentos entre plantas femininas e hermafroditas, direcionando o banco de germoplasma para um conjunto de linhas puras.

O coeficiente de endogamia ( $F$ ) é um parâmetro que afeta diretamente a diversidade genética de uma população, resumindo de forma conveniente a sua estruturação. Os iniciadores CP71 e CP80 apresentaram os valores de endogamia mais elevados (1,00), levando a uma fração de decréscimo na frequência de heterozigotos e resultando em um aumento das frequências dos homozigotos e na fixação dos alelos.

Oscilações nas frequências alélicas, perda e fixação de alelos podem ser indicativos de deriva genética ou de seleção (Tabela 4). A análise das frequências alélicas é de grande importância, pois pode refletir melhor os efeitos aleatórios do que a maioria dos parâmetros utilizados no estudo de genética de populações, uma vez que tais parâmetros não refletem diretamente frequências alélicas eventualmente muito baixas (OLIVEIRA et al., 2002).

Tabela 4. Composição alélica e variação no tamanho de pares de bases (pb), em 15 locos polimórficos selecionados de *Carica papaya* L. avaliados em 96 indivíduos. Cruz das Almas - BA, 2010.

Marcador	Alelos			Variação (pb)	
	Nº	Raro	Comuns		Frequentes
CP02	3		2	1	190-200
CP10	7	1	4	2	170-210
CP16	10	2	6	2	200-240
CP21	5		2	3	150-160
CP31	3		1	2	146-148
CP44	3		2	1	188-200
CP49	7		6	1	170-209
CP52	3		1	2	194-197
CP61	3		2	1	200-207
CP71	5		3	2	242-255
CP80	3		2	1	218-222
CP94	5		3	2	145-170
CP95	4		2	2	185-200
CP97	3		2	1	250-268
CP100	4		2	2	245-260

Alelo raro: <1%; 1% ≤ alelo comum ≤ 20%; e alelo freqüente >20%.

Do total de 68 alelos encontrados, 4,41% são alelos raros (de baixa frequência). A presença destes alelos pode ser importante na contribuição da variabilidade genética da espécie, porém, são sensíveis a perdas, em função da seleção de plantas para manutenção da coleção, sobretudo em função do sistema reprodutivo (hermafrodita) e morte de plantas por doenças como viroses, fitoplasmas e *Phytophthora*, principalmente. Foram detectados 40 alelos comuns, variando de um, para os iniciadores CP31 e CP52, a seis, para os iniciadores CP16 e CP49. Quanto aos alelos freqüentes, foram detectados 25 do total, apresentando variação de um a três. Oliveira et al. (2010b), analisando 30 acessos do mesmo BAG-Mamão e 18 variedades locais encontraram 3 alelos raros, 115 comuns e 119 freqüentes.

A frequência com que um alelo aparece mostra o quanto pode ser útil para ser usado para distinguir os genótipos, logo um alelo muito frequente, não é um bom parâmetro de diferenciação.

Estudos de natureza semelhante têm sido realizados em outras espécies, revelando a ampla aplicabilidade dos marcadores moleculares microssatélites. Raposo et al. (2007), estudando a diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre detectou 29 alelos raros com 7 locos de microssatélites. Por sua vez, Martinez (2008), estudando uma população de *Tabebuia rose-alba* e utilizando oito locos de microssatélites, encontrou 51 alelos raros que deverão ser transferidos para o BG-USP/RP (Banco de Germoplasma da USP de Ribeirão Preto) visando à conservação dos indivíduos amostrados.

## **CONCLUSÕES**

Os marcadores moleculares microssatélites são eficientes para estudos genéticos em *Carica papaya* L., por sua relevância estratégica na geração de informações genéticas a serem utilizadas em suporte a programas de melhoramento genético do mamoeiro.

Um excesso de homozigotos foi detectado, indicando a possível existência de um processo endogâmico entre os acessos analisados, decorrente de autofecundação ou de cruzamento entre indivíduos aparentados.

A análise de um maior número de locos poderá fornecer um conjunto abundante de marcadores genéticos importantes para análises moleculares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIANCHI, V.J. et al. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p. 490-493, 2004.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p. 314-331, 1980.

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.

DROOGENBROECK, V.B, et al. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p. 289-297, 2002.

LEMOS, E.G.M.; SILVA, C.L.S.P.; ZAIDAN, H.A. Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers. **Euphytica**, v.127, p. 179-184, 2002.

LIU, K.; MUSE, S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, v.21, p. 2128-2129, 2005.

MARTINEZ, M.L.L. **Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia rose-alba* conservados ex situ no Banco de Germoplasma de Floresta da USP de Ribeirão Preto**. 2008, 126f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, 2008.

OCAMPO PÉREZ, J. et al. Microsatellite markers in *Carica papaya* L: isolation characterization and transferability to *Vasconcellea* species. **Molecular Ecology Notes** v.6, p. 212-217, 2006.

OCAMPO PÉREZ, J. et al. Papaya genetic diversity assessed with microsatellite markers in germplasm from the Caribbean Region. **Acta Horticulturae**, v.740, p. 93-101, 2007.

OLIVEIRA, A.F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifra langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p. 331-338, 2002.

OLIVEIRA, E.J. et al. Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.12, p. 1747-1754, 2007.



OLIVEIRA E.J. et al. Identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio de exploração do banco de dados de DNA. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.30, n.3, p. 841-845, 2008.

OLIVEIRA, E.J. et al. Polymorphism microsatellite markers set for *Carica papaya* L. and its use in molecular-assisted selection. **Euphytica**, v.173, p. 279-287, 2010a.

OLIVEIRA, E.J. et al. Polymorphism of microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.28, p.519-530, 2010b.

OLSON, M.E. Intergeneric relationships within the Caricaceae - Moringaceae clade (Brassicales) and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. **International Journal Plant Sciences**, v.163, n.1, p. 51-63, 2002.

PÉREZ, J.O. et al. Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* Species. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.6, n.1, p. 212-217, 2006.

RAPOSO, A. et al. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.42, n.9, 2007.

SANTOS, S.C. et al. A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p. 263-267, 2003.

SERAFIM, D.C.S. et al. Melhoramento genético da videira na Embrapa Uva e Vinho: utilização de marcadores microssatélites para proteção intelectual e aferição da identidade genotípica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém, PA, 2002.

SILVIA, F.F. **Abordagem clássica e molecular do melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2006, 133f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacazes-RJ, 2006.

SIQUEIRA, W.J.; FONSECA, M.I.S; SONDHAL, M.R. Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura *in vitro*. **Bragantia**, v.47, n.1, p. 1-8, 1988.

TAN, S.C.; WEINHEIMER, E.A. The isoenzyme patterns of developing fruit and leaf of papaya (*Carica papaya* L). **Sains Malays**, v.5, p. 7-14, 1976.

## **CAPÍTULO 2**

### **ESTRUTURAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE MAMOEIRO DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE MAMÃO (BAG- MAMÃO) DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo submetido ao Comitê Editorial do Periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira

## **ESTRUTURAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE MAMOEIRO DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE MAMÃO (BAG-MAMÃO) DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL**

RESUMO: O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, além de ter grande importância sócio-econômica no Brasil. Entretanto, a baixa variabilidade genética coloca em risco o desenvolvimento de novas variedades que atendam as demandas por genótipos mais produtivos e adaptados às variações climáticas. Com o objetivo de determinar a estruturação da variabilidade genética do mamoeiro, foram analisados 96 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), utilizando 15 marcadores microssatélites. As frequências alélicas foram utilizadas para se calcular a distância genética entre os acessos. A matriz de distância genética foi obtida pelo programa PowerMarker, versão 3.25, utilizando a distância de Shared allele (SAD). A estruturação da variabilidade genética foi realizada mediante o programa MEGA 4.1, utilizando o método *Neighbor-joining*. A análise da estruturação da variabilidade genética, a partir da caracterização dos acessos, permitiu a formação de 23 agrupamentos e seis acessos não agrupados, evidenciando uma ampla diversidade na formação dos grupos. Em relação à confiabilidade do dendograma por bootstrap, observou-se que o maior valor foi encontrado no grupo 12 (46%). Os grupos 1, 4 e 17 foram os agrupamentos mais sensíveis às combinações dos genótipos avaliados, evidenciado pelo baixo valor de bootstrap (1%). A média da distância genética entre todos os genótipos estudados foi de 0,55, e o desvio padrão da média foi igual a 0,12. Diferentemente de resultados obtidos por outros autores, observou-se alta variabilidade passível de exploração nos programas de melhoramento do mamoeiro.

**Palavras-chave:** *Carica papaya* L., microssatélites, relação entre acessos, diversidade genética.

## **STRUCTURING OF GENETIC VARIABILITY IN ACCESSIONS OF ACTIVE PAPAYA GERMLASM BANK (APGM) OF EMBRAPA CASSAVA AND TROPICAL FRUITS**

**ABSTRACT:** Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the most cultivated and consumed fruits in tropical and subtropical regions of the world and has great socio-economical importance in Brazil. However, low genetic variability endangers the development of new varieties that meet the demands for higher yielding genotypes adapted to climate variations. Aiming to determine the structure of papaya genetic variation 96 accessions from the Papaya Active Germplasm Bank (Papaya-AGB) of Embrapa Cassava and Tropical Fruits (CNPMPF) were analyzed by using 15 microsatellite markers. The allele frequencies were used to calculate the genetic distance among genotypes. The genetic distance matrix obtained by the program PowerMarker version 3.25 was used to perform the cluster analysis of genotypes in the program MEGA 4.1 using the Neighbor- joining method. The analysis of genetic structure showed 23 clusters and six isolated accessions, evidentiating the wide diversity in the collection. The highest confidence interval estimated by bootstrap analysis was found for group 12 (46%), which is considered as a moderate value. Groups 1, 4 and 17 were the most sensitive to genotype combinations, what is evident from the low bootstrap value (1%). The average genetic divergence among all genotypes was 0.55 and the standard deviation was 0.12. Regarding the coefficient of determination ( $R^2$ ), we observed that 87.11% of the variation in genetic distances is explained by variations of the linear distance, indicating that there is genetic divergence among the accessions. Unlike the results obtained by other authors, were observed high variability which is exploitable in papaya breeding programs.

**Keywords:** *Carica papaya* L., microsatellites, relationship between accessions, genetic diversity.

## INTRODUÇÃO

A importância da cultura do mamoeiro é crescente no Brasil, sobretudo nas regiões Sudeste e Nordeste, tanto pelo volume comercializado quanto pelo número de propriedades em que é estabelecida. Entretanto, de acordo com Dantas (2000), a cultura do mamoeiro sustenta-se em uma base genética estreita, limitando o número de cultivares plantadas nas principais regiões produtoras. Populações com pouca variação genética podem ser incapazes de responder às mudanças ambientais, provocando a redução da adaptabilidade da população (MATOCQ; VILLABLANCA, 2001).

Por meio dos marcadores moleculares é possível gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relacionamento filogenético no germoplasma utilizado pelos melhoristas. Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando marcadores moleculares para estimar a diversidade genética existente nas coleções de germoplasma (PEREIRA; PEREIRA, 2006). O primeiro estudo da diversidade genética em mamoeiro foi feito por Tan e Weinheimer (1976), utilizando isoenzimas. Droogenbroeck et al. (2002) avaliaram 95 acessos pertencentes à espécie *Carica papaya* e espécies relacionadas aos gêneros *Vasconcellea* e *Jacaratia* quanto às relações genéticas, observando, por meio de marcadores AFLP, que os acessos foram agrupados dentro de cada espécie, validando a classificação taxonômica. Cattaneo et al. (1999) verificaram a divergência genética entre nove genótipos de mamoeiro dos grupos Solo e Formosa, utilizando marcadores RAPD. Sharon et al. (1992), utilizaram marcadores microssatélites e minissatélites para estudo de análise genética e de identificação e caracterização entre e dentro de espécies de *Carica*, comprovando que a técnica constitui-se numa ferramenta útil na identificação de espécies e de cultivares, podendo ser aplicada também na identificação de híbridos específicos e interespecíficos.

A confiabilidade destas análises tem garantido avanços nas pesquisas e vem se tornando cada vez mais importante para aumentar a eficiência dos resultados obtidos pelos melhoristas. A análise de agrupamentos que utiliza informações da matriz de distância genética tem sido muito utilizada por pesquisadores tanto da área de melhoramento genético vegetal quanto da área de recursos genéticos vegetais, para estruturar a variabilidade genética com o uso dos mais diversos tipos de caracterização das coleções de germoplasma, de constituições genéticas distintas. O dendograma é comumente utilizado para representação gráfica dos agrupamentos gerados a partir de métodos, sejam eles seqüencial, aglomerativo, hierárquico e sem sobreposição.

O objetivo deste trabalho foi analisar a estruturação da diversidade genética de 96 acessos de mamoeiro do BAG-Mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical com o uso do método *Neighbor-joining*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material genético**

Foram avaliados 96 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF) (Tabela 1), utilizando 15 marcadores microssatélites (Tabela 2), desenvolvidos por Oliveira et al. (2008), previamente selecionados com base no polimorfismo encontrado. Todas as análises foram conduzidas no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular (LVBM), da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), em Cruz das Almas - Bahia.

Tabela 1. Acessos de mamoeiro pertencentes ao Banco de Germoplasma do CNPMF com suas respectivas espécies, procedência e origem. Cruz das Almas - BA, 2009.

N°	Acessos	Espécie	Procedência	Origem
1	CMF002	<i>Carica papaya</i> L.	Cenargen	Costa Rica
2	CMF003	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Taiwan
3	CMF005	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	
4	CMF006	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Havaí
5	CMF007	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
6	CMF008	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
7	CMF010	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
8	CMF011	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Costa Rica
9	CMF012	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
10	CMF014	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
11	CMF017	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Taiwan
12	CMF018	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Taiwan
13	CMF020	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasil
14	CMF021	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasil
15	CMF022	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
16	CMF023	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Malásia
17	CMF024	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Costa Rica
18	CMF027	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	
19	CMF028	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Costa Rica
20	CMF029	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	
21	CMF031	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Costa Rica
22	CMF032	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Costa Rica
23	CMF034	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	

Continuação

24	CMF037	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	
25	CMF38	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
26	CMF39	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
27	CMF040	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
28	CMF041	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
29	CMF043	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
30	CMF044	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
31	CMF045	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
32	CMF046	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
33	CMF047	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Cruz das Almas - Brasil
34	CMF049	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Cruz das Almas - Brasil
35	CMF054	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Havaí
36	CMF055	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
37	CMF056	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
38	CMF058	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
39	CMF065	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
40	CMF066	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	
41	CMF067	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
42	CMF068	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
43	CMF069	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Cruz das Almas - Brasil
44	CMF070	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
45	CMF074	<i>C. papaya</i> L.	EBDA - Conceição do Almeida	Conceição do Almeida - Brasil
46	CMF078	<i>C. papaya</i> L.	Faz. S. Silv. Linhares	Brasil
47	CMF079	<i>C. papaya</i> L.	IAC – Campinas	Brasil
48	CMF080	<i>C. papaya</i> L.	Cruz das Almas	Havaí
49	CMF081	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	
50	CMF082	<i>C. papaya</i> L.	Universidade de Natal	África do Sul
51	CMF087	<i>C. papaya</i> L.	Havaí	



Continuação

52	CMF088	<i>C. papaya</i> L.	Havaí (Hilo)	
53	CMF092	<i>C. papaya</i> L.	Havaí (Hilo)	
54	CMF094	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Carazinhos - RS
55	CMF097	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Minas Gerais
56	CMF102	<i>C. papaya</i> L.	Cruz das Almas	Cruz das Almas - Brasil
57	CMF104	<i>C. papaya</i> L.	Namíbia	África do Sul
58	CMF105	<i>C. papaya</i> L.	CPATC	
59	CMF107	<i>C. papaya</i> L.	CPATC	Umbaúba - SE
60	CMF108	<i>C. papaya</i> L.		África do Sul
61	CMF114	<i>C. papaya</i> L.		África do Sul
62	CMF115	<i>C. papaya</i> L.		África do Sul
63	CMF118	<i>C. papaya</i> L.		Monte Santo
64	CMF123	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Tailândia
65	CMF125	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Gaia	Havaí
66	CMF128	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Gaia	Espírito Santo - ES
67	CMF129	<i>C. papaya</i> L.	Embrapa Amazônia	Manaus - AM
68	CMF154	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Guatemala
69	CMF157	<i>C. papaya</i> L.	Barra do Garças	Mato Grosso - Brasil
70	CMF165	<i>C. papaya</i> L.	Bela Vista	Mato Grosso do Sul - Brasil
71	CMF182	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
72	CMF188	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
73	CMF189	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
74	CMF191	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
75	CMF194	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
76	CMF195	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
77	CMF219	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
78	CMF223	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
79	CMF227	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF

Continuação

80	CMF228	<i>C. papaya</i> L.	Cenargen	Brasília - DF
81	CMF230	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Palmares	Porto Seguro - BA
82	CMF232	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Bello Fruit	Mucuri - BA
83	CMF233	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda Gondo	Nova Viçosa - BA
84	CMF234	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda São Francisco	Teixeira de Freitas - BA
85	CMF235	<i>C. papaya</i> L.	Fazenda São Francisco	Teixeira de Freitas - BA
86	CMF-L12-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
87	CMF-L30-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
88	CMF-L48-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
89	CMF-L62-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
90	CMF-L75-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
91	CMF-L88-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
92	CMF-L90-08	Linhagem PMGM	–	Brasil
93	Golden	Variedade		Brasil
94	Sunrise	Variedade		Brasil
95	Tainung	Híbrido		Brasil
96	Calimosa	Híbrido		Brasil

CMF= Centro de Mandioca e Fruticultura; PMGM = Programa de Melhoramento Genético do Mamoeiro.

Tabela 2. Relação das seqüências e características dos 15 pares de iniciadores de microssatélites selecionados para caracterização dos 96 acessos do BAG-Mamão. Cruz das Almas - BA, 2010.

Loco	Forward	Reverse	Tm (°C)	Alelo (pb)	Motivos
CP02	AGGCGAAATCGGAAGAGAG	CTGGTAAAACGACGATGACG	59	144	(AGG) <sub>9</sub>
CP10	AAAAATCACAGCACGTATGGTT	GAAATTACAAATGGGCAAAAAG	58	183	(TACA) <sub>4</sub> (TA) <sub>9</sub> (GA) <sub>10</sub>
CP16	TCAACTATTTCCCCGCATA	CACCTCCTTGTCCAAAGGTT	60	217	(AT) <sub>13</sub>
CP21	ATCGACCGAGGAAGGTACG	TCAAAAACCCATTGAGTCTGC	60	151	(GT) <sub>12</sub>
CP31	AAGGGTACGTCATGGAGCA	TCTGTGCGCCTTTTATACTCTTG	57	153	(AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>10</sub>
CP44	TGACAACGAACTACATCCCTA	CCTCATGGTTTGTGTACTCCT	56	232	(AT) <sub>12</sub>
CP49	CCTGAAAGCAACCATTTCTA	TCGCTGGAGCTGTAAGAGA	56	201	(AT) <sub>12</sub>
CP52	GGAAAGATCATAGAAACAGTGG	TGCTATCTTGGTTGTCTCTCA	55	196	(AT) <sub>10</sub> (AG) <sub>12</sub>
CP61	GGAGTGATGTAAGTGCCTCAT	CATGAGCCCTACTCCGAAC	57	205	(AT) <sub>12</sub> + (AC) <sub>8</sub>
CP71	TCCCCAACCTCAAGAAGATAA	TTACACCACCATCGCCATC	59	250	(CT) <sub>14</sub>
CP80	GTGGCAATGAACTCGGCTA	ATCCTCCCTCCACCAACAG	59	219	(TC) <sub>12</sub>
CP94	TCGCAGAGAAAGAGAAAGCA	TCCTCTCACCAGTTATTGGAA	58	169	(AG) <sub>12</sub> at(AG) <sub>7</sub>
CP95	CAGTCCTTGCAGGCGATTA	CTCAACCATTTTTCTCACCA	60	183	(AG) <sub>6</sub> tg(AG) <sub>7</sub>
CP97	TTTCTGTTACCTCTCTCGGATT	GAGATGACAACCATACAGCAA	56	262	(TA) <sub>11</sub>
CP100	TGATCGCTTTTCGCTTCACT	GATTTCACTGCCACGGACT	58	294	(GA) <sub>11</sub> + (AG) <sub>23</sub>

Tm (temperatura média)

### **Extração e amplificação do DNA total**

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando a técnica de Doyle & Doyle modificada. A quantidade e qualidade do DNA foram verificadas em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídio. A concentração do DNA das amostras foi estimada por comparação visual (intensidade de fluorescência) de fragmentos de DNA com concentrações conhecidas (DNA fago  $\lambda$  a 25, 50, 100 e 250 ng).

As reações de amplificação foram realizadas para um volume de 15  $\mu$ l, contendo: 30,0 ng de DNA genômico; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 10 mM Tris/KCl, 100  $\mu$ M de dNTPs; 0,3mM de cada iniciador e uma Unidade de *Taq* polymerase e água MilliQ estéril para completar o volume.

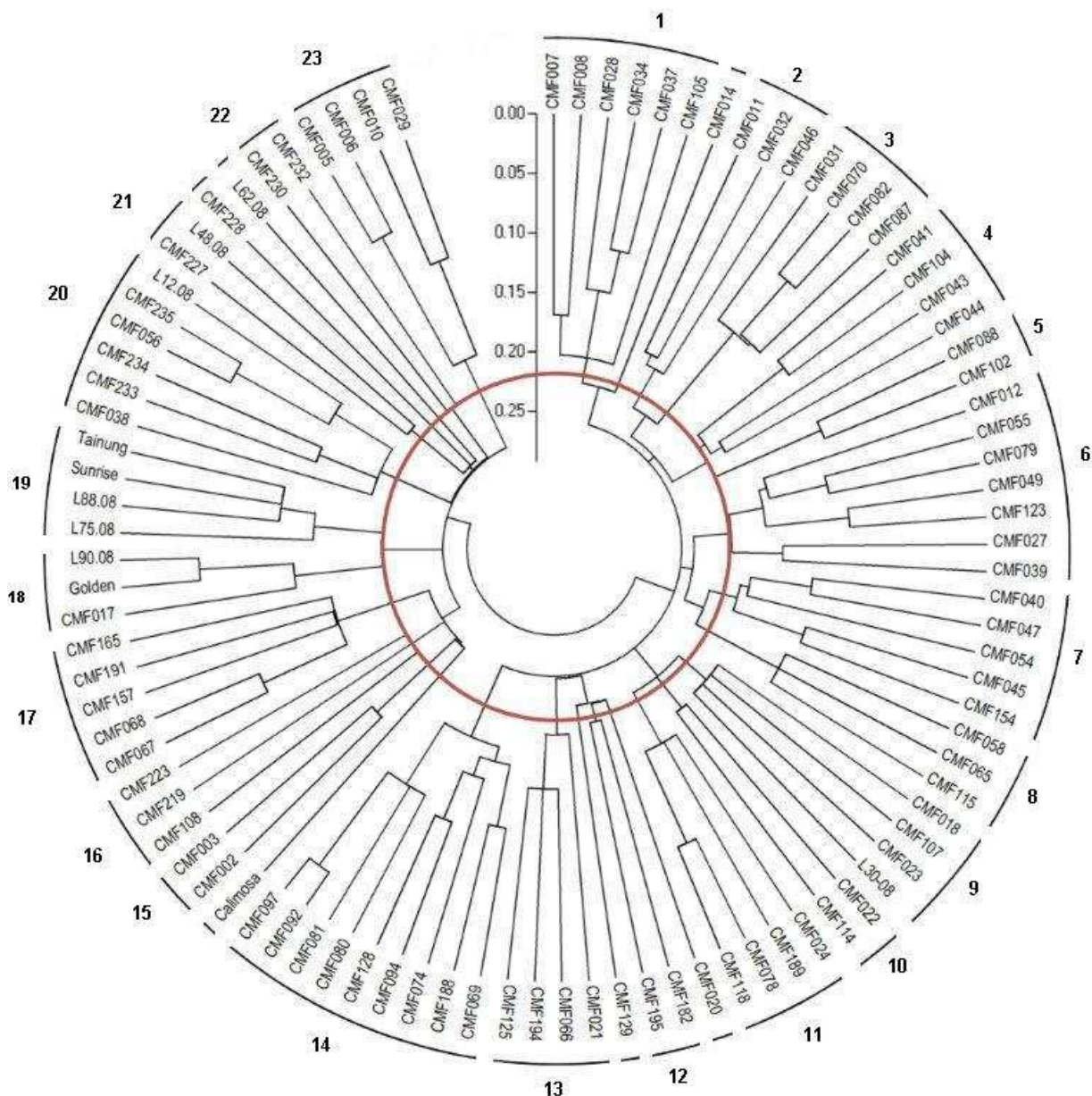
As reações foram submetidas a 30 ciclos de amplificação após a desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos. Cada ciclo consistiu de 50 segundos a 94°C, (temperatura de anelamento variando de 55 a 62°C, de acordo com o iniciador), por 50s, 1 minuto a 72°C e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos das amplificações foram avaliados em géis de agarose 1000 (Invitrogen) a 3%, corados com brometo de etídeo e em géis desnaturantes de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata (Creste et al., 2001). O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb (New England Biolabs).

### **Análise dos dados**

A matriz de distância genética foi obtida pelo programa PowerMarker versão 3.25 (Liu & Muse, 2005), utilizando a distância de Shared allele (SAD). A estruturação da diversidade genética foi realizada mediante o programa MEGA 4.1 (TAMURA et al. 2007), com o uso do método *Neighbor-joining*. A estabilidade dos agrupamentos foi computada por meio da análise de Booststrap com 1.000 reamostragens.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados das análises de agrupamentos estão representados no dendograma construído com base na distância genética, O círculo em vermelho (“Linha de Fenon”) representa o ponto de referência para definir os agrupamentos (Figura 1).



**Figura 1.** Dendrograma formado a partir da matriz de distância de Shared allele (SAD), utilizando o método Neighbor-joining, com base na distância compartilhada de alelos de 15 marcadores microssatélites utilizando 96 acessos de germoplasma do Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas - BA, 2010.

A análise do dendrograma mostra uma pequena distância genética entre os acessos CMF097 e CMF092, pertencentes ao grupo 14, e uma maior dispersão na distância genética entre os acessos dos grupos 6, 16 e 22.

Ao traçar uma linha de corte no dendograma (“Linha de Fenon”), a uma distância genética de 0,22, foram formados 23 agrupamentos e seis acessos não agrupados, evidenciando uma ampla diversidade na formação dos grupos.

Observa-se que 90,6% dos acessos de germoplasma de mamoeiro encontram-se abaixo da linha de corte. A alocação dos genótipos dentro dos grupos foi realizada de acordo com a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada um dos grupos.

Com exceção dos grupos 10 e 15, formado apenas por acessos oriundos de outros países, todos os outros grupos apresentaram acessos brasileiros, evidenciando que não há correlação entre o padrão de agrupamento e o país de origem dos acessos. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Oliveira et al. (2010), ao constatarem que os acessos brasileiros foram agrupados em todos os grupos formados. Em contraposição a estes resultados, Ocampo Pérez et al. (2007), analisando 72 genótipos de mamão da região do Caribe, utilizando 15 marcadores microssatélites, constataram que, com poucas exceções, eles foram agrupados de acordo com sua origem geográfica.

Seis grupos foram formados apenas por dois acessos (grupos 5, 10, 12, 15, 21 e 22), sendo que os grupos 10 e 15 foram formados exclusivamente por acessos provenientes da Malásia, África do Sul, Costa Rica e Taiwan.

O quarto grupo foi formado por quatro acessos, sendo três provenientes de Conceição do Almeida-BA (CMF041, CMF043 e CMF044) e um proveniente da África do Sul (CMF104). Já o sexto grupo foi composto por sete acessos (CMF012, CMF055, CMF079, CMF049, CMF123, CMF027 e CMF039), sendo um proveniente da Malásia e outro da Tailândia. Quanto ao sétimo grupo, foi composto por três acessos brasileiros (CMF040, CMF047 e CMF045) e dois acessos estrangeiros (CMF054 e CMF154, provenientes do Havaí e da Guatemala, respectivamente).

Em relação às sete linhagens utilizadas na análise, pode-se observar que foram agrupadas em cinco grupos (grupos 9, 18, 19, 20 e 21), sendo que a L62-08 permaneceu isolada dos demais acessos.

O grupo 12 foi formado por dois acessos, ambos originários do Distrito Federal. O grupo 14 foi constituído por nove acessos (9,36 %), sendo o maior agrupamento entre os 23 grupos formados. Dentre estes nove acessos um é proveniente da região de Cruz das Almas-BA.

O último grupo, 23, foi dividido em dois subgrupos formados pelos acessos CMF010 e CMF029, e pelos acessos CMF005 e CMF006.

Por sua vez, os acessos CMF014, CMF020, CMF129 e CMF228, juntamente com o híbrido Calimosa e a linhagem L62-08, apresentaram-se distintos dos demais, não se encaixando em nenhum grupo.

Estudos semelhantes utilizando marcadores microssatélites também vêm sendo desenvolvidos com outras culturas para avaliar a diversidade genética e estruturação de populações. Faleiro et al. (2004), realizaram um estudo da variabilidade genética em 30 acessos de *Theobroma cacao*, selecionados para resistência à vassoura-de-bruxa, demonstrando que os marcadores microssatélites são ferramentas confiáveis para estudo de divergência genética, pois disponibilizam para os pesquisadores dados claros, de fácil distinção e interpretação, além de serem reproduzíveis. Gao et al. (2002) verificaram que os microssatélites apresentaram nível muito alto de diversidade genética na avaliação da estrutura genética de populações de arroz, quando comparados com aloenzimas. Além disso, os microssatélites foram mais eficientes do que as aloenzimas em detectar a diferenciação genética na população estudada.

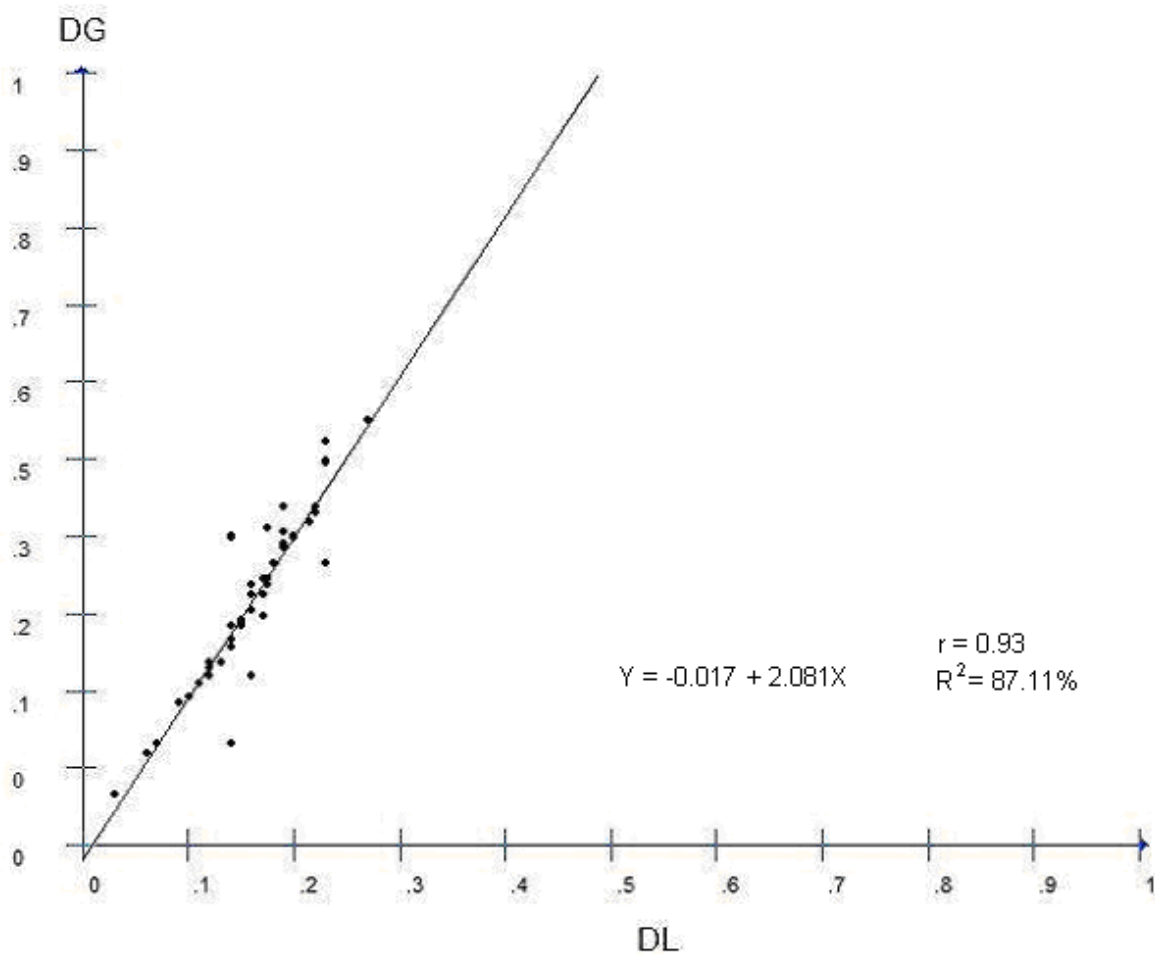
A média da divergência genética entre todos os genótipos estudados, obtida pela matriz de distância genética, foi 0,55, e o desvio padrão da média foi igual a 0,12.

Baseado na distância de Shared allele (SAD) entre os 96 acessos, obteve-se uma similaridade média de 0,45, muito semelhante ao valor 0,48 obtido por Ocampo Pérez et al. (2007), e inferior ao valor 0,88 obtido por Kim et al. (2002), no estudo da diversidade genética entre *C. papaya* a partir de marcadores AFLP utilizando a distância de Dice. Dessa forma, os marcadores microssatélites revelaram um polimorfismo maior do que os outros marcadores de DNA (OCAMPO PÉREZ et al., 2007), sendo extremamente úteis na análise de parentesco, seleção assistida, clonagem de genes, formação de grupos heteróticos, identificação de duplicatas de acessos e análise de variação molecular em espécies/acessos com base genética estreita como é o caso do mamoeiro.

Relações genéticas entre *Carica papaya* e espécies selvagens também têm sido investigadas. Van Droogenbroeck et al. (2002), utilizando AFLP, analisaram a diversidade genética entre *Carica papaya*, oito espécies de

*Vasconcellea* e duas de *Jacaratia*. Foram formados três grupos principais, reunindo os acessos em nível de gênero, sugerindo que *C. papaya* divergiu do resto do gênero no início de sua evolução.

Mediante análise da Figura 2, observa-se que o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), obtido entre as distâncias genéticas e distância de ligação, foi de 0,93, revelando um bom ajuste do dendograma.



DG = Distância Genética; DL = Distância de Ligação

**Figura 2.** Diagrama de dispersão da distância genética e distância de ligação de 96 acessos de mamoeiros do Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF). Cruz das Almas - BA, 2010.



## CONCLUSÕES

A análise do dendograma permitiu a estruturação da variabilidade genética de acessos de mamoeiro em diferentes grupos.

Os grupos 6, 12 e 22 foram os mais distantes, podendo ser explorados em programas de hibridação entre os acessos de mamoeiros avaliados, a partir da orientação de novos cruzamentos, obtenção de linhagens e síntese de híbridos.

Em geral, os dados gerados com os marcadores microssatélites mostraram que, apesar da base genética estreita que caracteriza a espécie *Carica papaya* L., a variabilidade foi relativamente alta, passível de exploração nos programas de melhoramento do mamoeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CATTANEO, L.F. et al. Avaliação de divergência genética em mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando marcadores RAPD. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45. **Anais...**, Gramado: SBG. 1999, p. 524.

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.

DANTAS, J.L.L. Introdução. In: TRINDADE, A.V. **Mamão, Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000, p. 9.

DROOGENBROECK, V.B, et al. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p. 289-297, 2002.

KIM, M.S. et al. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. **Genome**, v.45, p. 503–512, 2002.

LIU, K.; MUSE, S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, v.21, p. 2128-2129, 2005.

MATOCQ, M.D.; VILLABLANCA, F.X. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern?. **Biological Conservation**, v.98, p. 61-68, 2001.

OCAMPO PÉREZ, J. et al. Papaya genetic diversity assessed with microsatellite markers in germplasm from the Caribbean Region. **Acta Horticulturae**, v.740, p. 93- 101, 2007.

OLIVEIRA, E.J. et al. Polymorphism of microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.28, p.519-530, 2010b.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S. Marcadores moleculares no Pré-Melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. e CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, p. 85-106, 2006.

SHARON, D. et al. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of *Carica papaya* and other *Carica* species. **Euphytica**, v.62, p. 119-126, 1992.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p. 1596-1599, 2007.

TAN, S.C.; WEINHEIMER, E.A. The isoenzyme patterns of developing fruit and leaf of papaya (*Carica papaya* L.). **Sains Malays**, v.5, p. 7-14, 1976.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mamoeiro é uma fruteira cultivada em todos os países tropicais e regiões subtropicais do mundo. No Brasil, seu cultivo concentra-se em variedades provenientes de dois grupos, Solo e Formosa. Esta estreita base genética implica em fatores limitantes para a expansão da cultura, a exemplo da vulnerabilidade às doenças, pragas e variações edafoclimáticas.

A ampliação da base genética do mamoeiro mediante hibridação após conhecimento da caracterização e avaliação de recursos genéticos existentes (caracterização fenotípica e molecular, notadamente) é de fundamental importância para o conhecimento da diversidade genética na cultura, essencial para planejamento de estratégias de melhoramento e conservação de germoplasma, além de gerar introgressão de novos genes de interesse em variedades cultivadas, liberando uma ampla variabilidade genética nas gerações subsequentes (SIQUEIRA et al., 1988). Evidencia-se, portanto, a necessidade de fortalecer os programas de melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.) no Brasil, contribuindo para ampliação da base genética atual, gerando novas variedades e/ou híbridos comerciais para o plantio, que atendam tanto às exigências do mercado nacional quanto do mercado externo (MARIN et al., 2003).

A caracterização molecular permite a discriminação de acessos em bancos ou coleções de germoplasma, a identificação de duplicações e a prospecção da variabilidade intrínseca ou entre acessos de uma mesma espécie. Os marcadores moleculares vêm sendo uma alternativa excelente para o acesso a esse conhecimento, pois apresentam ampla capacidade de amostragem do genoma (SILVIA et al., 2006).

Os marcadores microssatélites SSR são especialmente importantes, pois possuem alta reprodutibilidade, simplicidade e a rapidez da técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de utilização, grande poder de resolução e principalmente a codominância (BRONDANI et al., 1998; RALLO et

al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006), caracterizando-se como importante ferramenta pela precisão e rapidez na manipulação da variabilidade genética.

A variabilidade genética pode ser acessada por meio do uso simultâneo de marcadores moleculares e morfológicos, assegurando a seleção de genótipos com comprovada superioridade. Ambos os marcadores são importantes ferramentas que se complementam na avaliação da variabilidade genética de determinada população, tornando a análise mais completa e precisa.

A caracterização molecular de 96 acessos de mamoeiro com o uso de marcadores microssatélites e posterior avaliação do seu potencial de uso na detecção de variação genética do BAG-Mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, demonstrou o sucesso dos marcadores moleculares microssatélites para estudos genéticos em *Carica papaya* L., além de possibilitar a definição de novas estratégias de conservação do germoplasma de mamoeiro.

Os acessos também foram avaliados quanto à estruturação da variabilidade genética, utilizando técnicas de marcadores microssatélites, comprovando a variabilidade genética existente entre eles através da formação de 23 agrupamentos e seis acessos não agrupados (CMF14, CMF020, CMF129, Calimosa, CMF228 e a linhagem L62-08), evidenciando uma ampla diversidade na formação dos grupos.

Pode-se concluir que entre os 96 acessos analisados, 23 grupos mostraram-se divergentes, possuindo variabilidade genética que permite o potencial uso desses acessos em programas de melhoramento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRONDANI, R.P.V. et al. Development, characterization and mapping of microsattelite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, n.5-6, p. 816-827, 1998.

MARIN S.L.D. et al. Hibridação de mamão. In: MARTINS DS **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Incaper, Vitória-ES, p. 173-188, 2003.

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, 2006.

RALLO, P.; DORADO G.; MARTIN, A. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.101, n.5-6, p. 984-989, 2000.

SILVIA, F.F. **Abordagem clássica e molecular do melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2006, 133f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacazes-RJ, 2006.

SIQUEIRA, W.J.; FONSECA, M.I.S; SONDHAL, M.R. Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura *in vitro*. **Bragantia**, v.47, n.1, p. 1-8, 1988.