

## **ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM MAMOEIRO POR MEIO DE MARCADORES AFLP**

Laercio Francisco Cattaneo<sup>1</sup>, Messias Gonzaga Pereira<sup>2</sup>, Cláudia Fortes Ferreira<sup>3</sup>,  
Gonçalo Apolinário de Souza Filho<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, DSc., Pesquisador, Incaper, CRDR – Linhares – ES, [lfcattaneo@ig.com.br](mailto:lfcattaneo@ig.com.br), <sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, PhD, Prof. Associado, LMGV/UENF – Campos dos Goytacazes – RJ, <sup>3</sup> Engenheira Agrônoma, DSc., Pesquisadora, Embrapa, CNPMF – Cruz das Almas – BA, <sup>4</sup> Engenheiro Agrônomo, DSc., Prof. Associado, CCB/UENF – Campos dos Goytacazes – RJ.

### **INTRODUÇÃO**

A variabilidade genética dos principais genótipos de mamoeiros havaianos do grupo 'Solo' e dos híbridos do grupo 'Formosa' é pouco estudada. O conhecimento da variabilidade genética entre as diversas populações de mamoeiros é importante para o desenvolvimento de cultivares superiores e também para a seleção de progenitores visando à exploração dos efeitos da heterose em cultivares híbridas.

Os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) se baseiam na amplificação seletiva, via PCR (Polymerase Chain Reaction), de fragmentos de DNA genômico total, gerados pela clivagem com enzimas de restrição (ZABEAU e VOS, 1993; VOS et al., 1995; LIU, 1998). A análise de AFLP tem sido empregada de forma crescente com o propósito de estudos de DNA 'fingerprinting', de divergência genética, de mapeamento genético localizado e de construção de mapas genéticos, independentemente da espécie e da complexidade do DNA (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores AFLP se destacam pelo grande número de fragmentos que detectam em apenas um gel, tornando-se muito eficientes na amostragem do genoma. O grande poder de detecção de variabilidade genética advém da exploração simultânea da presença e ausência de sítios de restrição – a exemplo dos marcadores RFLP – e da ocorrência de amplificação de seqüências arbitrárias – como nos marcadores RAPD. Outra vantagem dos marcadores AFLP é a robustez, quando comparados ao RAPD. A utilização de iniciadores mais longos no AFLP, a fase de PCR, aumenta a especificidade da amplificação, evitando, dessa forma, a competição que ocorre durante a PCR na análise RAPD (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; RAMALHO et al., 2000).

A principal limitação dos marcadores AFLP é serem marcadores dominantes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; LIU, 1998; RAMALHO et al., 2000). Dessa forma, apenas um alelo é detectado, ou seja, o que é amplificado e visualizado no gel. Os genótipos homocigotos não podem ser diretamente separados dos heterocigotos e o padrão de bandas se caracteriza por fornecer dados binários, ou seja, presença e ausência de banda. Eventualmente, de acordo com Liu (1998), as marcas podem ser identificadas como codominantes.

O objetivo do trabalho foi avaliar a divergência genética entre 22 genótipos de mamoeiros, provenientes do Estado do Espírito Santo e do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UENF, utilizando-se marcadores AFLP.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

A análise de DNA do mamoeiro por meio de marcadores AFLP foi realizada no Laboratório de Melhoramento

Genético Vegetal, Setor de Genética Aplicada, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, localizado em Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro.

Os 22 genótipos de mamoeiros avaliados foram: 'Sunrise Solo', 'Improved Sunrise Solo Line 72/12', 'Baixinho de Santa Amália', 'Caliman G', 'Caliman SG', 'Caliman D', 'Caliman GB', 'Santa Bárbara', 'São Mateus', 'Grampola', 'Kapoho Solo', 'Saint Pierre', 'Sunrise Solo 783', 'Waimanalo', todos de origem havaiana do grupo 'Solo'; 'JS - 11', 'JS - 12', 'Costa Rica', 'Maradol', 'Tailândia', do grupo 'Formosa'; e os dióicos 'Califlora' e Andy.

O isolamento do DNA genômico foi feito de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações, utilizando-se amostras compostas de folhas jovens, coletadas em seis plantas de cada genótipo estudado (Figura 1).

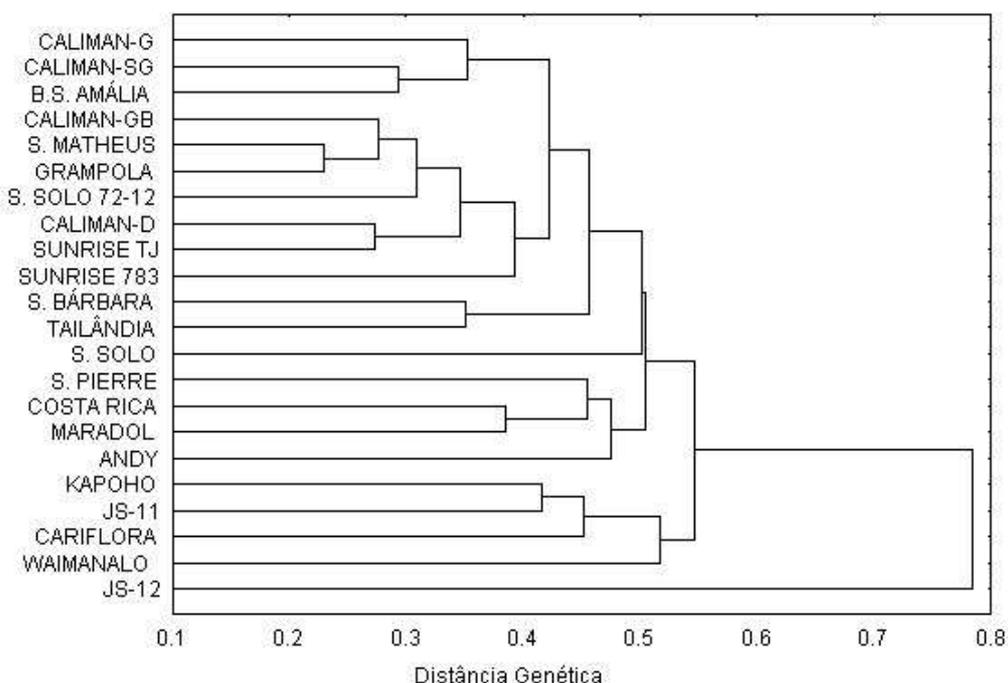


FIGURA 1 – Dendrograma da dissimilaridade genética de 22 genótipos de mamoeiro, com base em marcadores AFLP, obtido pelo método UPGMA, utilizando-se a distância do complemento aritmético do índice de Jaccard.

A técnica AFLP consiste, basicamente, de quatro etapas: 1) digestão do DNA genômico com duas enzimas de restrição, com diferentes frequências de corte, ou seja, uma de corte raro *EcoRI* e outra de corte frequente *MseI* – ligação de adaptadores aos sítios de clivagem; 2) amplificação pré-seletiva, via PCR, com iniciadores que vão se ligar às extremidades que receberam os adaptadores; 3) amplificação seletiva, via PCR, com iniciadores marcados; e 4) resolução dos fragmentos em gel de poliacrilamida.

A resolução dos fragmentos amplificados e marcados com fluorescência foi feita utilizando-se o seqüenciador automático de DNA APPLIED BIOSYSTEM - ABI Prism 377, em placas de 36cm, previamente preparadas com o gel de poliacrilamida. O tempo de corrida foi de três horas, e as imagens do gel foram processadas pelo software 'GeneScan Analysis'. Posteriormente, utilizou-se o software 'Genotyper DNA Fragment Analysis' para efetuar as análises dos polimorfismos, obtendo-se uma matriz binária de ausência (0) e outra de presença (1).

Os dados obtidos com os marcadores AFLP foram analisados por meio de análise multivariada, visando estimar a dissimilaridade genética e o posterior agrupamento entre os 22 genótipos estudados. No agrupamento

dos genótipos utilizou-se o método hierárquico UPGMA (*unweighted pair-method using an arithmetic average*), (DIAS, 1998). Nesta etapa de agrupamento e obtenção do dendrograma, utilizou-se o programa computacional Statistica 5.0 (Statsoft, 1995).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de DNA por marcadores AFLP, e as três combinações de iniciadores utilizados (CAG – ACT; CAG – AGG; CAG – ACC), possibilitaram a obtenção de 64 locos monomórficos e 119 locos polimórficos.

Na Figura 1, encontra-se o dendrograma da distância genética dos 22 genótipos com base em análises AFLP, obtido pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizando-se o método hierárquico UPGMA. Verifica-se que os genótipos foram agrupados em seis grupos. No primeiro grupo, formado exclusivamente por genótipos pertencentes ao grupo 'Solo', ficaram agrupados 'Caliman-G', 'Caliman-SG' e 'B.S. Amália', 'Caliman-GB', 'S. Matheus', 'Grampola', 'S. Solo 72-12', 'Caliman-D', 'S. Solo TJ' e 'S. Solo 783'. No segundo grupo ficaram os genótipos 'S. Bárbara' e 'Tailândia', enquanto no terceiro grupo ficou somente o genótipo 'S. Solo'. O quarto grupo foi formado pelos genótipos 'S. Pierre', 'Costa Rica', 'Maradol' e 'Andy'. No quinto grupo ficaram agrupados os genótipos 'Kapoho Solo', 'JS-11', 'Cariflora' e 'Waimanalo'. O genótipo 'JS-12' ficou agrupado no sexto grupo. Os marcadores AFLP, nas condições em que foram realizadas as análises dos 22 genótipos de mamoeiro, mostraram-se adequados ao estudo da diversidade genética do mamoeiro, proporcionando uma discriminação dos genótipos, em relação às características de cada genótipo e em relação ao grupo a que pertencem, 'Solo' ou 'Formosa'.

## CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nas condições em que este trabalho foi conduzido permitem tirar as seguintes conclusões:

- Detectou-se ampla divergência genética entre os 22 genótipos de mamoeiros analisados, especialmente entre aqueles do grupo 'Solo' e do grupo 'Formosa'.
- Os marcadores AFLP mostraram-se consistentes na detecção de variabilidade entre os 22 genótipos estudados, permitindo discriminá-los em seis grupos distintos.
- Os marcadores AFLP possibilitaram detectar divergências entre os grupos de genótipos pertencentes ao grupo 'Solo' e aqueles pertencentes aos grupos 'Formosa' e 'Dióico'.

## REFERÊNCIAS

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (ed.) **Eletrforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1988, p.405-475.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. New York: CRC Press, 1998. 611p.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.dos.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras, MG: UFLA, 2000. 472p.

STATSOFT, **STATISTICA for Windows**. Tulsa, OK: Statsoft, 1995.

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

ZABEAU, M.; VOS, P. **European Patent Application**. Publication nº: EP 0534858, 1993.