

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade genética molecular em germoplasma de mangueira**

**Carlos Eduardo de Araujo Batista**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciências. Área de concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba  
2013**

Carlos Eduardo de Araujo Batista  
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

## **Diversidade genética molecular em germoplasma de mangueira**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **JOSÉ BALDIN PINHEIRO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor  
em Ciências. Área de concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba  
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Batista, Carlos Eduardo de Araujo

Diversidade genética molecular em germoplasma de mangueira / Carlos Eduardo de Araujo Batista.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

103 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Diversidade genética 2. Germoplasma vegetal 3. Manga 4. Marcador molecular  
I. Título

CDD 634.441  
B333d

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

*Aos meus pais “Francisco e Carmelita”, por todo amor, apoio,  
incentivo, e por sempre acreditarem em mim...*

*Dedico.*

*Aos meus amigos e colegas, os quais se  
tornaram parte de minha família...*

*Ofereço.*



## AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela qualidade do ensino e estrutura oferecida e oportunidade de realizar o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudo

Especialmente o Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, por toda confiança, apoio, paciência, orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ e em Ciências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pelos conhecimentos compartilhados.

À Dra. Maria Imaculada Zucchi do Pólo Centro Sul - APTA pelo suporte, amizade, coorientação e confiança.

Ao Dr. Michael J. Wingfield, da Universidade de Pretória pela oportunidade e ensinamentos no estudo do fungo *Ceratocystis fimbriata*.

Aos amigos do Laboratório de Diversidade Genética Melhoramento: Giu, Fátima, Alessandro, Michelle, Aluana, Miklos, Filipe, Vitor, Mário, Marcelo, Eleonora, Fabiani, Fernanda Raquel, Regina, Camila, Kênia, Mônica e Mariza pelo aprendizado mútuo e convívio agradável.

À minha família, pelo seu amor incondicional, compreensão pela distância, e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos amigos conquistados em Piracicaba, os quais sempre me proporcionaram momentos de alegria e descontração, em especial a Helen, Onildo e Maria Aparecida por todo apoio nos momentos mais críticos.

Aos amigos que mesmo distantes, sempre me deram apoio e incentivo.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta tenham contribuído para a realização deste trabalho.

A Piracicaba por torna-se tão importante na minha vida e obrigado aquela gelada que proporcionou bons momentos!



## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
Referencias.....	24
2 NOVO CONJUNTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>Mangifera indica</i> .....	27
Resumo.....	27
Abstract.....	27
2.1 Introdução.....	27
2.2 Material e Métodos.....	29
2.2.1 Material Vegetal.....	29
2.2.2 Extração de DNA.....	31
2.2.3 Desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida de microssatélites..	31
2.2.4 Sequenciamento de clones.....	33
2.2.5 Sequencias enriquecidas, identificação e análise de microssatélites.....	35
2.2.6 Desenho dos iniciadores de microssatélites de mangueira.....	35
2.2.7 Otimização dos iniciadores.....	36
2.2.8 Gel de poliacrilamida, eletroforese, coloração e genotipagem.....	37
2.2.9 Análise dos locos microssatélites de mangueira.....	38
2.3 Resultados e Discussão.....	38
2.3.1 Extração do DNA do germoplasma de mangueira.....	38
2.3.2 Enriquecimento da biblioteca genômica e desenho dos iniciadores.....	39
2.3.3 Condição de amplificação e otimização dos iniciadores de microssatélites.....	41
2.3.4 Caracterização dos locos microssatélites.....	42
Referencias.....	45
3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DO BANCO DE GERMOPLASMA BRASILEIRO DE MANGUEIRA.....	47
Resumo.....	47



Abstract.....	47
3.1 Introdução.....	47
3.2 Material e Métodos.....	49
3.2.1 Material vegetal.....	49
3.2.2 Genotipagem da população de mangueira.....	56
3.3 Resultados e Discussão.....	57
3.3.1 Caracterização molecular.....	57
3.3.1.1 Alelos privados.....	63
3.3.1.2 Diversidade genética.....	64
3.3.2 Análise da estrutura e diversidade genética de mangueira.....	67
3.3.3 Análise da distância genética e agrupamento.....	70
3.3.4. Análise de coordenadas principais.....	72
3.3.5 Simulação de uma coleção nuclear.....	73
Referencias.....	76
4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AGROMORFOLÓGICA DE 103	
ACESSOS DE MANGUEIRA.....	79
Resumo.....	79
Abstract.....	79
4.1 Introdução.....	80
4.2 Material e Métodos.....	81
4.2.1 Extração de DNA.....	81
4.2.2 Amplificação dos locos de microssatélites e genotipagem.....	84
4.2.3 Caracteres avaliado em campo.....	85
4.2.4 Análise dos dados.....	87
4.2.4.1 Análise de agrupamento.....	87
4.2.4.2 Matrizes de distância.....	87
4.2.4.3 Estrutura populacional.....	89
4.3 Resultados e Discussão.....	89
4.3.1 Análise de agrupamento.....	89
4.3.1.1 Variáveis categóricas, contínuas, moleculares.....	89
4.3.1.2 Análise baseada em distância e agrupamento.....	93
4.3.1.3 Análise da estrutura populacional.....	95
Referencias.....	99

CONCLUSÕES.....	103
-----------------	-----



## RESUMO

### Diversidade Genética Molecular em Germoplasma de Mangueira

A manga (*Mangifera indica* L.) é uma fruta tropical de origem no continente asiático e umas das principais frutas comercializadas no mundo. A mangicultura apresenta potencial para expandir ainda mais a comercialização de frutos e derivados principalmente, com qualidades para exportação. A produção mundial em média é de 27 milhões de toneladas. Os programas de melhoramento de mangueira necessitam desenvolver cultivares que apresentem o maior número de características agronômicas agregadas. O conhecimento da variabilidade e estrutura genética é almejado pelos melhoristas uma vez que a espécie é perene e apresenta longo o período para obtenção de novas cultivares. Neste trabalho, 151 acessos de mangueira foram analisados quanto a diversidade e estrutura genética do banco de germoplasma. Foram desenvolvidos 23 marcadores microssatélites para caracterização do banco de germoplasma de mangueira. Os locos microssatélites apresentaram alto poder informativo para estudos populacionais e observaram-se médias da heterozigosidade esperada de  $H_e=0,655$ , heterozigosidade observada de  $H_o=0,496$  e de  $PIC = 0,621$ . Posteriormente a partir dos dados moleculares foram estimados a diversidade e estrutura genética dos 151 acessos e observaram-se 144 alelos com média de 7,2 alelos por loco com amplitude entre 2 e 12 alelos, e uma diversidade gênica média de 0,689. Em todas as simulações estatísticas utilizadas houve consistência em se agrupar os acessos em dois grupos, um grupo formado pelos acessos brasileiros e outro com os acessos norte americanos e os novos híbridos. Uma coleção nuclear foi formada com 30 acessos conseguindo manter 100% dos alelos considerando a diversidade molecular dos 151 acessos de mangueira. Para disponibilizar mais informações ao banco de germoplasma de mangueira da EMBRAPA, 103 acessos contendo informações de 20 locos microssatélites e médias de 48 características agromorfológicas foram avaliadas em conjunto pelo método de otimização de Tocher e formaram-se 23 grupos, onde mais de 50% dos acessos formaram 22 grupos; destes, 10 grupos foram formados por acesso único. Com a finalidade de gerar mais informações para programas de melhoramento da mangueira, um teste de atribuição foi realizado a partir dos dados moleculares e fenotípicos qualitativos, em que também os acessos foram agrupados em dois grandes grupos.

Palavras-chave: Pré-melhoramento; *Mangifera indica*; Variabilidade; Microssatélites



## ABSTRACT

### Molecular genetics diversity on Mango Tree Germplasm

The mango (*Mangifera indica* L.) is a tropical fruit of Asiatic origin and one of the main fruits traded worldwide. The mango crop presents a potential for further expansion of fruits and derivative trades mainly export qualities. The average world production is 26 million tons. Breeding programs need to develop mango cultivars having the highest aggregate number of agronomic traits. Knowledge of both the genetic variability and structure is aimed by mango culture breeders due to perennial species as well as to the long period of time to obtain new cultivars. In this study, the genetic diversity and structure of the germplasm bank in 151 accessions of mango were analyzed. At first, 23 microsatellite markers were developed in order to extract molecular information from bank germplasm. It was possible to detect that the SSR loci were highly informative in the studied population. Averages were obtained of  $H_e = 0.655$ ,  $H_o = 0.496$  and  $PIC = 0.621$ . Next, with the molecular data it was possible to estimate the genetic diversity and structure of the 151 accessions as well as observe 144 alleles with an average of 7.2 per locus with amplitude between 2 and 12 alleles; the average gene diversity was 0.689. In all simulations there were consistent statistic analyzes enabling the clustering cultivars in two groups. A group was formed by Brazilian landraces and a second group was formed by North American landraces and Brazilian new hybrids. A core collection of 30 accessions was able to keep 100% of the alleles representing the molecular diversity of 151 mango cultivars. To provide more information to the Embrapa germplasm mango tree, 103 accessions containing information from 20 microsatellite loci and average of 48 agronomic traits were assessed together by the method of Tocher and formed 23 groups. Twenty two groups were formed by more than 50% of accessions while 10 groups were formed by a single accession each. An interactive test was conducted from molecular and qualitative phenotype data which resulted in two consistent clusters.

Keywords: Pre breeding; *Mangifera indica*; Variability; Microsatellite



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Manga vermelha indiana e manga amarelada de origem filipínica... 19
- Figura 2.1 - Extração de DNA CTAB 3% de cultivares de mangueira (*Mangifera indica*) do banco de germoplasma da Embrapa Semiárido. A qualidade e concentração do DNA foi comparada com padrões de 25 ng ( $\lambda$ 1), 50 ng ( $\lambda$ 2), 100 ng ( $\lambda$ 3), 150 ng ( $\lambda$ 4), 200 ng ( $\lambda$ 5) de DNA do fago  $\lambda$ , em eletroforese em gel de agarose 1,0%, TBE 1X (120V), corado com SYBr safe..... 39
- Figura 2.2 – Percentual de motivos de microssatélites encontrados na biblioteca genômica construída para *Mangifera*..... 40
- Figura 2.3 – Amplificação com 3 genótipos de mangueira, diferentes temperaturas de anelamento, (A) 64°C, (B) 62°C, (C) 60°C e nove locos (Min22, Min23, Min24, Min25, Min26, Min27, Min28, Min29, Min30)..... 41
- Figura 3.1 – Valores médios de: a) LNP(D) de Pritchard et al. (2000) e b)  $\Delta K$  de Evanno et al. (2005) para 20 repetições de simulações no programa Structure com K de 1 a 10 para os 151 acessos do Banco de germoplasma da Embrapa..... 68
- Figura 3.2 – Análise da estrutura populacional para o valor K=2 mais provável, subpopulação 1 composta por acessos norte americanos e novos híbridos nacionais e subpopulação 2 composta em sua maioria pelos acessos de origem brasileira..... 69
- Figura 3.3 – Dendrograma de 151 genótipos (150 mangueiras da Embrapa e um porta enxerto usado por produtores na região sudeste) baseado na distância de Roger-W modificada e pelo agrupamento de Neighbor Joining. Em azul (híbridos e acessos norte americanos), verde (acessos brasileiros), em laranja acessos de diferentes origens e em vermelhos as três espécies diferentes de *Mangifera*..... 71
- Figura 3.4 – Análise de coordenadas principais de 151 acessos de mangueira feita pela distância de Rogers-W modificada. Em amarelo (outras espécies de *Mangifera*), azul (híbridos), verde (acessos brasileiros) e



em vermelho (cultivares norte americanas).....	73
Figura 3.5 – Distribuição do índice de diversidade Shannon Weaver (A) e Nei (B) para 20 locos de microsatélites na coleção inteira e na coleção nuclear do banco de germoplasma de mangueira da Embrapa.....	75
Figura 4.1 – Dendrograma baseado na soma das distâncias de Roger-W modificado, coeficiente de Jaccard para dos dados categóricos e Distancia Euclidiana para dos dados contínuos, a partir de dados moleculares e agromorfológicos, apresentando a relação genética entre 103 acessos de magueira ( <i>Mangifera indica</i> ). Em vermelho os acessos com maior produção de polpa e os acessos circulados em azul os com menor produção de polpa.....	93
Figura 4.2 – $\Delta K$ de Evanno et al (2005) para 20 repetições de simulações no programa Structure K = 1 a 10 para 103 acessos de mangueira conjunto de dados com apenas dados (a - moleculares) e ( b - moleculares e morfológico).....	96
Figura 4.3 – Os 103 acessos de mangueiros alocados em dois grupos identificados na análise da estrutura populacional K=2 para os dois conjuntos de dados (apenas molecular; molecular e morfológico).....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Acessos utilizados para testar os locos de microssatélites.....	30
Tabela 2.2 - Iniciadores de Microssatélites para manga ( <i>Mangifera indica</i> ).....	36
Tabela 2.3 – Parâmetros de diversidade e polimorfismo utilizados para a descrição de locos SSR em Mangueira.....	44
Tabela 3.1 - Acessos de Mangueiras do Banco de germoplasma da Embrapa Semiárido utilizados no estudo da diversidade e estrutura genética.....	51
Tabela 3.2 – Frequência alélica para o Banco de Germoplasma de mangueira ( <i>Mangifera indica</i> ).....	59
Tabela 3.3 – alelos privados dos 151 acessos de mangueira.....	63
Tabela 3.4 – Parâmetros genéticos utilizados para analisar a diversidade do banco de gemoplasma de mangueira. N (número de alelos), (GD) diversidade gênica, ( $H_o$ ) heterozigosidade, PIC (conteúdo de informação polimórficas), (f) índice de fixação.....	66
Tabela 3.5 - Trinta acessos de mangueira compõe a coleção nuclear do banco de germoplasma da Embrapa Semiárido obtida pela simulação do programa PowerCore a partir da coleção de 151 acessos.....	74
Tabela 4.1 – Relação dos 103 acessos utilizados no estudo da variabilidade genética de mangueira ( <i>Mangifera indica</i> ).....	83
Tabela 4.2 - Iniciadores de Microssatélites para manga ( <i>Mangifera indica</i> ).....	84
Tabela 4.3 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando simultaneamente 12 variáveis contínuas, 36 categóricas e 20 moleculares em 103 acessos de mangueira do banco de germoplasma da EMBRAPA.....	91



## 1 INTRODUÇÃO

A mangueira *Mangifera indica* pertence à família das *Anacardiaceae* e é conhecida a mais de quatro mil anos e originou-se na região que se divide em dois Sub-Centros: o Indico-Burma-Tailandês e o Filipínico-Celeste/Timor. Estes dois sub-centros deram origem as duas raças de mangas hoje conhecidas pelos estudiosos da mangicultura: a raça indiana que possui frutos de formato oblongo ovalado com sementes monoembriônicas e, em geral, com casca rósea a vermelha e a raça filipínica ou indochinesa cujos frutos de formato longo com sementes poliembriônicas e casca variando de verde a amarela (Figura 1) (MUKHERJEE, 1985; BOMPARD, SCHNELL, 1997).



Figura 1.1 - Manga vermelha indiana e manga amarelada de origem filipínica

A mangueira é considerada uma espécie aloploplóide, mais provavelmente um anfidiplóide, ou seja, é um poliplóide constituído por dois complementos somáticos completos de duas espécies diferente sendo, predominantemente, uma espécie alógama.

Mukherjee (1985) descreve 39 espécies, enquanto, Bompard (1993) comenta a existência de 69 espécies e as classifica em dois subgêneros com diversas seções, baseados em caracteres morfológicos. A *Mangifera indica* é a mais importante, embora existam outras espécies que produzem frutos comestíveis, como *M. altíssima*, *M. caesia*, *M. lagenifera*, *M. macrocarpa*, *M. odorata* e *M. sylvatica*.

A manga dispersou-se por todos os continentes sendo cultivada, atualmente, na maioria dos países de clima tropical e subtropical. No Brasil e África foi introduzida no século XVI pelos Portugueses, dando origem, por meio de

sementes, a diversas variedades cultivadas (SUBRAMANYAM et al., 1971). As introduções pertenciam às mangas da raça Filipinica geralmente fibrosas e poliembriônicas, apresentando limitada variação genética. As variedades da raça Indiana são monoembriônicas e portadoras de melhor qualidade, apresentando grande variabilidade quando plantadas de pé franco. Acredita-se que a manga foi levada para as ilhas do Caribe, de onde os espanhóis a introduziram no México, sendo introduzida na Flórida/EUA inicialmente a partir do Caribe e posteriormente com material proveniente da Índia (VIRUEL et al., 2005).

De acordo com Ferreira et al. (2000), no Brasil houve uma segunda introdução de variedades melhoradas da raça indiana, proveniente da Flórida/EUA, portadoras de melhor qualidade, com sementes monoembriônicas. Este fato modificou sensivelmente a indústria mangicola nacional, dando um novo alento a cultura, pois essas variedades americanas, que produzem frutos com pouca fibra, coloridos e mais resistentes à antracnose, são mais comercializáveis, permitindo inicialmente ampliar o excelente mercado interno, e conseqüentemente, permitiu a conquista do mercado externo, notadamente Estados Unidos, Japão e a Comunidade Européia são os principais importadores da fruta que ainda é usada em sua maior parte em consumo *in natura* (PIZA JR., 1989; SOUZA et al., 2002). No entanto, a primeira cultivar proveniente da Flórida apenas foi plantada comercialmente na década de 60 e foi a cultivar Haden, mas apresentou uma série de limitações, principalmente com relação a suscetibilidade à seca da mangueira e a alternância de produção.

O genoma da mangueira tem aproximadamente  $4.39 \times 10^8$  bp (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991). A *Mangifera indica* é a espécie com o número de cromossomos ( $2n = 40$ ) (KOSTERMANS, BOMPARD, 1993; IYER, DEGANI, 1997). E Singh (1966) em seus estudos relatou a ocorrência de espécies tetraplóides com número de cromossomos ( $2n = 2x = 80$ ). Segundo Mukherjee (1963) estudos citogenéticos proporcionaram evidências de que há um grande potencial no melhoramento da espécie quando se usam outras espécies do gênero *Mangifera*, principalmente, visando obtenção de híbridos interespecíficos de importância agrônômica e comercial.

A produção mundial de manga é estimada em 27 milhões de toneladas, e é considerada a segunda fruta tropical mais importante no mundo. A produção dessa fruta é a quinta maior estando atrás apenas de banana, uva, maçã e laranja.

A Índia, China, Tailândia, México, Paquistão e Indonésia são responsáveis por mais de 75% da produção mundial da cultura, e somente a Índia é responsável por 40% da produção (VIRUEL et al., 2005; BALLY; LU; JOHNSON, 2009). E segundo Wyzykowsky et al., (2002), o México, Brasil, Paquistão, Filipinas, Índia e Holanda são responsáveis por quase 70% das exportações mundiais de manga, o México sendo o principal exportador.

O Brasil é o sétimo maior produtor de manga no mundo com uma produtividade de 1.546.000 toneladas no ano de 2007 e o primeiro em produtividade por hectare 17 t/ha (FAO, 2009). Em 2009, a produção, segundo a Embrapa, foi de 1.197.694 toneladas (EMBRAPA, 2010). As regiões com maior produção são a região Nordeste com 73,41%, seguido pela região Sudeste com 24,83%. É a fruta tropical mais aceita pelo mercado consumidor, isso pelo sabor agradável e valor nutricional (DONADIO; FERREIRA, 2002).

Segundo Bally et al. (2009) a produção desta fruta desempenha um papel importante na economia rural de muitos países tropicais. No entanto, apesar do grande volume da produção de manga quase toda produção é consumida internamente no país de origem. E menos de 4% da produção é exportada. Esse baixo percentual em exportação da fruta reflete uma baixa qualidade dos frutos pela alta perecibilidade.

Os frutos de mangueira mais cultivados e comercializados internacionalmente tem origem na Florida ou foram derivados destes cultivares. E os cultivares com maior aceitação são a Tommy Atkins, Haden, Kent, Keitt e Palmer. Isso pelo fato desses frutos apresentarem características coloração forte (avermelhados) e vida útil mais longa. Esta ultima característica permite a exportação para todos os continentes do mundo. Outro mercado de interesse e que está se desenvolvendo é a produção para mercados próximos o que viabilizou a produção de cultivares como Carabao das Filipinas e a Sindri de origem Paquistanesa; esses frutos são mais perecíveis que os cultivares comerciais de origem na Florida, mas suportam o transporte regional sem grande perda na qualidade do fruto (BALLY; LU; JOHNSON, 2009).

O mercado da manga ainda necessita que o melhoramento de plantas obtenha variedades com maior produtividade e qualidade dos frutos. Então os programas de melhoramento de mangueira têm que se adequarem e realizar

melhoramento para regiões específica, tentando suprir as exigências de mercado e as restrições de produção.

O processo de melhoramento genético é altamente dependente da amplitude da base genética disponível, que por sua vez é influenciada pelo acervo de recursos úteis disponíveis, na forma de materiais coletados e caracterizados, mantidos nos bancos de germoplasma, que são insumos importantes para o desenvolvimento de novas cultivares. A capacidade de acessar esses genótipos portadores de variabilidade, por coleta ou por intercâmbio, é o fator fundamental para o sucesso de qualquer programa de melhoramento genético vegetal (QUEIROZ; LOPES, 2007).

A caracterização molecular da diversidade genética no germoplasma pode fornecer dados úteis para auxiliar o melhorista na seleção de genitores de populações básicas ao estabelecer programas de melhoramento. Tais populações são estabelecidas pelo cruzamento de materiais superiores, objetivando-se freqüentemente a maximização da distância genética com a finalidade de recombinar genes ou complexos gênicos em novas combinações gênicas favoráveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Hedrick (2001) a descoberta de locos altamente variáveis, como os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), representou maior precisão no poder estatístico disponível para determinar diferenças entre grupos de espécies. Este aumento deve-se ao fato desse marcador conseguir acessar outro nível de informações no genoma em estudo. Em comparação com outros marcadores baseados na PCR como os RAPD e AFLP grande parte das informações genéticas podem ser perdidas ou não acessadas.

A utilização de marcadores microssatélites baseia-se na amplificação de regiões contendo seqüências simples repetidas utilizando-se um par de *primers* específicos complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Segmentos amplificados a partir destes sítios quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada microssatélite, constitui um loco genético altamente variável, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O alto índice de polimorfismo e a elevada taxa de mutação fazem dos marcadores SSR uma excelente ferramenta para estudos de genética de populações. A definição de um modelo mutacional teórico para SSR é obrigatório para estimar os inúmeros parâmetros em genética de populações a partir da heterozigosidade observada (OLIVEIRA et al., 2006). Nenhum dos modelos teóricos existentes inclui todas as variáveis que influenciam na dinâmica mutacional dessas sequências, no entanto, um modelo deverá ser escolhido *a priori*.

Os microssatélites além de sua utilidade no mapeamento e melhoramento genético tornaram-se os marcadores preferidos para “fingerprinting” da maioria das espécies de plantas. Grupta e Varshney (2000) ressaltam o alto polimorfismo, co-dominância e reprodutibilidade. Em espécies como a manga e a maioria das árvores frutíferas, em que há poucas seqüências disponíveis em bancos de dados de seqüências pública. Viruel et al., (2005) analisaram 28 cultivares de mangueira com 16 marcadores microssatélites e observaram que este tipo de marcador torna muito interessante o estudo de variabilidade, conservação de germoplasma e genealogia. Os autores acrescentam ainda ser necessário estudo com um maior número de genótipos para elucidar o processo de domesticação da mangueira.

Segundo Frankel (1984) a diversidade genética contida nos acessos dos bancos de germoplasma continua a ser um desafio significativo. O conceito de coleção nuclear foi desenvolvido há 25 anos para facilitar o acesso à diversidade de uma amostra que possa ser melhor gerenciada e representativa, em que a análise será concentrada antes de voltar a explorar mais amplamente outros materiais. A lógica das coleções nucleares foi exaustivamente discutida e para muitas espécies levou a subconjuntos de germoplasma contendo três mil acessos ou mais. Na prática, as coleções nucleares com milhares de acessos torna seu uso em programas de melhoramento genético muito trabalhoso e inviável, e como consequência os curadores têm preferido centrar-se em dezenas a centenas de acessos.

Smith (1989) comenta que a caracterização de uma variedade, linhagem ou híbrido com marcas de DNA tem se tornado uma ferramenta importante na proteção de plantas melhoradas nos países onde existem leis regulamentando o assunto. O “fingerprinting” com marcadores moleculares tem sido importante em processos que envolvam disputas de direito autoral e tem sido considerado



instrumental como suporte ao contínuo investimento em melhoramento de plantas por parte de grandes empresas produtoras de sementes híbridas.

Existem duas maneiras básicas de avaliar a divergência genética: de natureza quantitativa ou preditiva (MIRANDA et al., 1988). Entre os métodos de natureza quantitativa de avaliação da divergência, ou da heterose manifestada nos híbridos, citam-se as análises dialélicas. Nestes métodos é necessária a avaliação dos genitores e de todas as combinações híbridas. Quando o número de genitores é elevado, a obtenção do material experimental pode ser impraticável. Por dispensarem a obtenção prévia das combinações híbridas, os métodos preditivos da divergência genética têm merecido considerável ênfase. São métodos preditivos aqueles que tomam por base as diferenças morfológicas apresentadas pelos genitores na determinação da divergência, que é geralmente quantificada por uma medida de dissimilaridade (CRUZ, CARNEIRO; 2006).

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver marcadores de microssatélites para caracterização da diversidade e estrutura genética do banco de germoplasma de mangueira da Embrapa.

## Referencias

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology. Report**. New York, v. 9, p. 208-218, 1991.

BALLY, I.S.E; LU, P.; JOHNSON, P.R. Mango Breedin. In: JAIN MOHAN, S.; PRIYADARSHAN, P.M. (Ed.). **Breeding Platation Tree Crops: Tropical Species**. New York: Springer: 2009. 653p.

BOMPARD, J. M. The genus *Mangifera* rediscovered: the potencial contribution of wild species to mango cultivation. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 341, p. 69-71, 1993.

BOMPARD, J.M. ; SCHNELL, R.J. Taxonomy and systemaics. In: LITZ, R.E. (Ed.). **The Mango; Botany, Production and Uses**. Wallington: CAB Internacional, 1997. p.21-47.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2006. v.1, 480p.

DONADIO, L. C.; FERREIRA, F.R. Mangueira. In (Ed.). BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. 422p.

EMBRAPA (2010) Fonte: **IBGE** - Produção Agrícola 2009. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Manga\\_Brasil\\_2009.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Manga_Brasil_2009.pdf) Acesso em: 20 Maio 2012.

FAO (2009). Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acesso em: 20 Maio 2012.

FERREIRA, F. R.; PINTO, A. C. Q. Tropical and subtropical fruits genetic resources in Brasil. In: GALAN SAUCO V. (Ed.). **Proceedings of second MESFIN Meeting in Fruit Production**. Madeira: FAO/Gobierno de Canarias. 1998. p. 39-62.

FERREIRA, F. R.; POSSIDIO, E. L.; SOARES, N. B.; CASTRO NETO, M. T.; PINTO, A. C. Q.; DONADIOA, L. C.; FREITAS, G. B. **Germoplasma de manga no Brasil**.: disponível em: [http://www.cpatia.embrapa.br/public\\_eletronica/downloads/OPB784.pdf](http://www.cpatia.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB784.pdf) Acessado em: 13 Abr. 2010.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3.Ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

FRANKEL, O. H. Genetic perspective of germplasm conservation. In ARBER, W.; LLIMENSEE, K.; PEACOCK, W.J.; STRALINGER, P. (Ed.). **Genetic Manipulations: Impact on Man and Society**. Melbourne: Cambridge University Press, 1984. 170p.

GRUPTA, P. K.; VARSHNEY R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis in bread wheat. **Euphytica**, Wageningen, v.113, p.163-185, 2000.

HEDRICK, W. Conservation genetics: Where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 16, p. 629-636, 2001.

IYER, C. P. A.; DEGANI, C. Classical Breeding and Genetics. In: Litz, R. E. (Ed.). **The Mango: Botany, Production and Uses**. New York, CAB International, 1997. p.49-68p.

KNIGHT, R.J.; SCHNELL, R. J. Mango introduction in Florida and the 'Haden' cultivar's significance to the modern industry. **Economic Botany**. New York, v.48, p. 139-145, 1994.

KOSTERMANS, A. J. G. H; BOMPARD, J.M. **The mangoes, their botany, nomenclature, horticulture and utilization**. London: Academic Press, 1993. 352p.

KRISHNA, H. SINGH, S. K. Biotechnological in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement – A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, p. 223-243, 2007.

MIRANDA, J.E.C.; CRUZ, C.D.; COSTA, C.P. Predição do comportamento dos híbridos de pimentão (*Capsicum annum* L.) pela divergência genética dos progenitores. **Revista Brasileira de Genética**, Riberão Preto, v. 11, p. 929-937, 1988.

MUKHERJEE, S. K. Cytology and breeding of mango. **Punjab Horticultural Journal**, Punjab, v. 3: p.107-115, 1963.

MUKHERJEE, S. K. **Systematic and ecogeographic studies of crop gene pools**:  
1. *Mangifera* L. Rome: IBPGR Secretariat, 1985. 86p.

PEREIRA, A.V.; VENCovsky, R.; CRUZ, C.D. Selection of botanical and agronomical descriptors for the characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.15, p.115-124, 1992.

PIZA JR, C. T. A situação da cultura da mangueira em São Paulo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANGICULTURA, 1989, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP/FCAVJ, 1989. p. 31-46.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M A. Importância dos Recursos Genéticos Vegetais para o Agronegócio. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa, 2007. Cap. 2, p. 61-119.

SINGH R. N. **Mango**. New Delhi: ICAR; 1996. 50p.

SMITH, J. S. C. The Characterization and assessment of genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) hybrids that are widely grown in France: Chromatographic data and isozymic data. **Euphytica**, Wageningen, v.43, p. 73-85, 1989.

SOUZA, V. A. B. DE; LIMA, P. S. DA C.; FERREIRA, M. E. Genetic Analyses of Mango Genotypes by RAPD Markers. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MANGA, 2002, Recife. **Anais...** Recife: EMBRAPA, 2002. p.7.

SUBRAMANYAM, H.; KRISHNAMURTHY, S.; SUBHADRA, N.V.; DALAL, V. V.; RANDAHWA, G.; CHACKO, E. K. Studies on mineral breakdown, a physiological ripening disorder in Alphonso mangoes (*Mangifera indica* L.). **Tropical Sciences**. New York, v.13, p.203-211, 1971.

VIRUEL, M.A.; ESCRIBANO, P.; BARBIERI, M.; FERRI, M.; HORMAZA, J.I. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* L., anacardiaceae) with microsatellites. **Molecular Breeding**, Secaucus, v.15, p. 383-393, 2005.

WYZYKOWSKI, J.; ARAÚJO, J.L.; ALMEIDA, C.O. Mercado e comercialização. In: GENUÍ, P. J .C.; PINTO, A.C.Q. **A cultura da mangueira**. Petrolina: Embrapa infomação Tecnológica, 2002. 40p.

## 2 NOVO CONJUNTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Mangifera indica*

### Resumo

O desenvolvimento de novos marcadores de microssatélites é de fundamental importância para se estimar a variabilidade genética e assim contribuir para o melhoramento genético de manga. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e estimar o poder informativo de novos locos microssatélites desenvolvidos para o gênero *Mangifera*. Novos microssatélites foram desenvolvidos e 23 foram otimizados, sendo que com estes detectou-se um total de 117 alelos. O número de alelos por loco variou 1 a 8, com média de 5,52. Houve transferibilidade intergenérica em 100% dos locos desenvolvidos. Com o desenvolvimento destes novos locos microssatélites será possível estimar a diversidade genética de bancos de germoplasma bem como em populações naturais, além de serem utilizados no mapeamento genético.

*Palavras-chave:* SSR; Manga; Melhoramento genético; Germoplasma

### Abstract

The newly developed microsatellite markers are crucial to estimate the genetic diversity and relevant information to mango breeding. The aim of this study was to develop and estimate information of the new mango microsatellite loci. Twenty three new microsatellites were optimized and a total of 117 alleles was detected. The number of alleles per locus ranged from 1 to 8, with an average of 5.52. There was 100% transferability intergeneric of developed SSR markers. By means of the use of new microsatellites it will be possible to estimate the genetic diversity, population structure and mapping.

*Keywords:* SSR; Mango; Genetic breeding; Germplasm

### 2.1 Introdução

A manga é a quinta fruta mais produzida no mundo ficando atrás de banana, uva, maçã e laranja. É a segunda fruta tropical mais produzida (BALLY, LU, JONHSON, 2009). No entanto, o mercado da manga ainda necessita que o melhoramento de plantas obtenha variedades com maior produtividade e qualidade dos frutos. E assim aumentar o percentual de exportação desta fruta pelos países

produtores. Segundo Bally, Lu, Jonhson (2009) de toda produção de manga apenas 4% é exportado devido à baixa qualidade dos frutos.

Os programas de melhoramento de mangueira precisam adequar-se e realizar melhoramento para regiões específicas, tentando suprir as exigências de mercado e as restrições de produção.

De acordo com Krishna e Singh (2007) o melhoramento de plantas lenhosas e perenes como a mangueira apresentam vários problemas como longa fase juvenil, autoincompatibilidade, baixos pegamento de frutos, produção de uma única semente por fruto, polinização cruzada, poliembrionia, poliploidia, natureza heterozigótica, escasso conhecimento da herdabilidade dos caracteres de importância agrônômica, e ter poucas informações sobre caracteres quantitativos. Além disso, a mangueira cresce em diferentes áreas e condições agroclimáticas em que a ampla hibridização e recombinação de caracteres contribuíram imensamente com a diversidade genética (RAVISHANKAR et al., 2011); fato este de interesse, mas pouco estudado ainda.

A espécie *Mangifera indica* apresenta um genoma extenso com aproximadamente  $4.39 \times 10^8$  bp (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991). E para acessar toda essas informações do DNA abordagens moleculares oferecem uma alternativa e eficiente ferramenta para o melhoramento genético de mangueira (KRISHNA; SINGH, 2007). Segundo Hedrick (2001) a descoberta de locos altamente variáveis, como os microssatélites, representou maior precisão no poder estatístico disponível para determinar diferenças entre grupos de espécies. Este aumento deve-se ao fato desse marcador conseguir acessar outro nível (maior número de alelos) de informações no genoma em estudo.

Os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) além de sua utilidade no mapeamento e melhoramento genético tornaram-se os marcadores ideais para “fingerprinting” da maioria das espécies de plantas. Gupta e Varshney (2000) ressaltam seu alto polimorfismo, codominância e reprodutibilidade.

Em espécies como a mangueira e a maioria das árvores frutíferas, existe pouca disponibilidade de sequências depositadas nos bancos de dados. Viruel et al. (2005) analisaram 28 cultivares de mangueira com 16 marcadores microssatélites e observaram que este tipo de marcador torna muito interessante o estudo de variabilidade, conservação de germoplasma e genealogia. Os autores

acrescentam ainda ser necessário estudo com um maior número de genótipos para elucidar o processo de domesticação da mangueira.

O Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” recebeu material vegetal de mangueira para estudar o Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido visando organizar e disponibilizar informações relevantes para a cadeia produtiva da mangicultura Brasileira. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver novos marcadores e avaliar o poder informativo dos locos microssatélites para *Mangifera indica*.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Material Vegetal**

No desenvolvimento dos novos marcadores microssatélites de mangueira foram usados 32 genótipos de mangueira pertencentes ao Banco de germoplasma de mangueira da Embrapa Semiárido para testar o poder informativo dos novos locos. Para o desenvolvimento da biblioteca enriquecida foi utilizado o acesso Espada pela grande distribuição deste acesso nas regiões brasileiras (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Acessos utilizadas para testar os locos de microsatélites

Nº	Acesso	Embrionia	Origem
1	Ci Proc 06/85	Desconhecida	Brasil
2	Hilda	Pred. Poliembriônica	Brasil
3	Simmonds	Monoembriônica	Florida (USA)
4	Juazeiro III	Monoembriônica	Brasil
5	Kensington	Poliembriônica	Australia
6	Juazeiro IV	Poliembriônica	Brasil
7	Recife	Monoembriônica	Brasil
8	Amrapalli	Monoembriônica	Índia
9	Manga D'água	Poliembriônica	Brasil
10	65	Pred. Poliembriônica	Florida (USA)
11	Mallika	Monoembriônica	Índia
12	Edward	Monoembriônica	Florida (USA)
13	Salitre	Pred. Poliembriônica	Brasil
14	Scuper Many	Monoembriônica	Florida (USA)
15	Dama de Ouro	Monoembriônica	Brasil
16	Smith	Pre. Monoembriônica	Florida (USA)
17	Tyler Premier	Monoembriônica	Africa
18	Juazeiro VII		Brasil
19	Haden 2H	Monoembriônica	Florida (USA)
20	Juazeiro II	Poliembriônica	Brasil
21	CPR	Pred. Poliembriônica	Brasil
22	Surpresa	Poliembriônica	Brasil
23	Pingo de Ouro	Monoembriônica	Brasil
24	Keitt	Monoembriônica	Florida (USA)
25	Haden	Monoembriônica	Florida (USA)
26	Mastruz	Poliembriônica	Brasil
27	Espada Itaparica	Poliembriônica	Brasil
28	Princesa	Pred. Poliembriônica	Brasil
29	Rosary	Poliembriônica	Brasil
30	Kent	Monoembriônica	Florida (USA)
31	<i>Mangifera foetida</i>	---	Tailândia
32	<i>Mangifera odorata</i>	---	Borneo

### 2.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo mencionado por KHAN et al. (2007), com modificações. Colocou-se em microtubos de 2,5ml 400mg de folha de mangueira triturada. Em tubo, 800µL de tampão de extração pré-aquecido à 65°C (CTAB 3%, 2M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH8,0, PVP-40 2% e β-mercaptoetanol 0,6% no momento da extração). O material foliar junto com o tampão foram homogeneizado e colocados em banho-maria à 65°C por 50 min. Decorrido o tempo foram adicionados 600µL de CIA (CIA, 24:1 clorofórmio:álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. A precipitação do DNA foi realizada com 600µL de isopropanol gelado, com incubação a -20°C por 1h. E posteriormente, foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado, em duas etapas consecutivas, com etanol 70% e uma vez com etanol absoluto com centrifugação a 12.000 rpm por 3 min. O precipitado foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 100µL de TE (10mM Tris HCL pH 8,0 e 1mM EDTA, pH8,0). Para concluir a extração, cada amostra de DNA foi tratada com 1µL de RNase (10mg mL<sup>-1</sup>, Ribonuclease A (Sigma) a temperatura ambiente *overnight* e armazenados a -20°C.

A qualidade do DNA (concentração e pureza) foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0%, TBE 1X (89mM Tris, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA), a 100 V, corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado sob UV (Major Science Compact Digimage System). Para avaliar a quantidade de DNA extraído de todas as amostras foi usado DNA do fago λ, com concentrações variando entre 50 e 250ng.

### 2.2.3 Desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida de microssatélites

A construção da biblioteca genômica enriquecida de mangueira foi realizada com DNA genômico de um cultivar escolhido aleatoriamente, de acordo com o protocolo de Billotte et al. (1999) com modificações descritas por Dutech et al. (2000). A primeira etapa foi digerir 5µg de DNA com 5U da enzima de restrição *AfaI* (Invitrogen) e tampão 1X fornecida pelo fabricante, com volume final de 100µL, por 3 h a 37°C. Posteriormente, a digestão foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) por 2h a 60V.



Para aumentar o número de cópias dos fragmentos genômicos digeridos e garantir que todos os fragmentos tivessem uma terminação conhecida, foi feita a ligação aos adaptadores *Afa21* e *Afa25* (Integrated DNA Technologies, Inc.). A reação de ligação dos adaptadores foi feita com tampão 1X (10mM Tris-HCl, pH7,8; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM DTT; 5µg ml<sup>-1</sup> de BSA), 4µM de *Afa21*, 4µM de *Afa25*, 4U de T<sub>4</sub> DNA ligase (Invitrogen) e 6µL de DNA digerido, em um volume final de 50µL, por 2h a 20°C. Para finalizar o processo de ligação dos adaptadores e amplificação dos fragmentos digeridos foi realizada uma reação da Polimerase em Cadeia (PCR) usando um dos adaptadores como iniciador.

A reação de PCR foi condicionada em termociclador (BIO-RAD My Cycle) e composta por: 1X, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTP, 0,4µM *Afa21*, 3 U Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Science) e 5µL de reação de ligação de adaptadores, em volume final de 50µL. O programa para amplificação foi o seguinte: desnaturação inicial a 95°C por 4 min; 30 ciclos a 94°C por 30s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 8 min. Em seguida foi realizada a purificação dos produtos da reação com Quiaquick PCR Purification Kit (QIAGEN) de acordo com o fabricante.

Como objetivo de selecionar fragmentos contendo sequências SSR foram selecionadas por sondas biotiniladas, Biotina-III(CT)8 e Biotina-III(GT)8, complementares às sequências repetitivas GA e CA, e recuperados com Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega), seguindo recomendações do fabricante. O DNA purificado foi diluído na proporção 1:4 em água ultrapura e desnaturado a 95°C por 15min. Em seguida, ao DNA foram adicionados 13µL de SSC 20X (3M NaCl, 0,3M citrato de sódio, pH7) e 3µL de cada um dos oligos biotinilados e incubados à temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, microesferas magnéticas pré-lavadas foram adicionadas à mistura de hibridização e incubada a temperatura ambiente por 10 min. Os fragmentos contendo SSR foram recuperados, após magnetização, por meio de lavagens das microesferas em SSC 0,1X, em 250µL de água ultrapura e estocado a -20°C.

O número de cópias dos fragmentos selecionados foi amplificado via PCR, com tampão 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM de *Afa21*, 3U de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Science) e 20 µL de suspensão de fragmentos selecionados, volume final de 100µL. O condicionamento da reação foi feita em termociclador BIORAD My Cycle, com desnaturação inicial a 95°C por 4 min, 30

ciclos a 94°C por 40s, 60°C por 1min e 72°C por 1min; e extensão final a 72°C por 8 min. A amplificação da reação de PCR foi testada por meio de gel de agarose 1%, TBE 1X (100V), corado com SYBR safe (Invitrogen).

Após visualizar a amplificação dos fragmentos, estes foram clonados com pGEM-T Easy Vector System (Promega), seguindo recomendações do fabricante. Em seguida foi feita a transformação com células de *Escherichia coli* linhagem TOP10 (Invitrogen) preparadas termoquímicas competentes. Os insertos foram transformados em um evento independente, seguido de dois eventos controle. Um total de 95 colônias brancas (clones transformados) foram isoladas e transferidas para meio 2YT-HMFM líquido (1,6% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 0,0076% de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,045% de citrato de sódio, 0,09% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,4 de glicerol, 0,18% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,47% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), com 100µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina em placa do tipo ELISA. Em seguida foi fechada com adesivo (ABgene). A placa com os clones foram incubados a 37°C por 18h, finalizado o tempo, a placa foi etiquetada e armazenada em ultrafreezer a -80°C.

## 2.2.4 Sequenciamento dos clones

Os 95 clones mais o controle negativo foram preparados para o sequenciamento. Antes do sequenciamento estes foram multiplicados em meio LB líquido contendo 100µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina em placa com 96 canaletas de poço fundo (ABgene), os clones permaceram a 37°C por 22 h sob agitação a 300 rpm (G24 Environmental Incubator Shaker). Após período de incubação para crescimento dos clones. Estes foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e 240 µL de GTE (0,92% glicose, 26 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EDTA pH 8) foi adicionado em cada poço, a placa foi agitada em vortex por 2 min ou até que os clones estivessem suspensas na solução de GTE. Em seguida foi centrifugado a 4.000 rpm por 6 min, o sobrenadante foi descartado.

Foi adicionado a cada *pocinho* 80 µL de GTE e imediatamente, agitado em vortex por 5 min, 60µL da suspensão foi transferida para placa ELISA (Costar) contendo 5 µL de RNase 10 mg mL<sup>-1</sup> (Ribonuclease A, Sigma) e 60 µL de 0,2 mM NaOH, 1% SDS por poço. A placa foi selada com adesivo selador (ABgene) e os clones foram misturados por inversão e incubada a temperatura ambiente por 10 min. Posterior ao *spin* com rotação máxima de 1.000 rpm, 60 µL de acetato de

potássio 3 M gelado foram adicionados a cada poço, a placa foi selada e misturada por inversão. Foi retirado o adesivo da placa e incubada a 90°C por 30 min. A placa foi colocada no gelo para esfriar e em seguida foi centrifugada a 4.000 rpm por 4 min. Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para uma nova placa ELISA com uma placa filtro (Millipore) acoplada fixada com adesivo para ser realizada a filtração do sobrenadante e foi centrifugada novamente a 4.000 rpm por 4 min a 20°C. Ao filtrado foram adicionados 110 µL de isopropanol. A placa novamente foi selada com adesivo (ABgene), misturada por inversão e centrifugada a 4.000 rpm por 45 min a 20°C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 170 µL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 5 min a 20°C. Em seguida houve o descarte do sobrenadante, foi realizada um spin com as placas invertidas com rotação de 1.000 rpm e baixa aceleração, os precipitados secaram a temperatura ambiente e foram ressuspensos em 60 µL de água ultrapura. Posteriormente, a extração plasmidial foi observada em eletroforese em gel de agarose 1,0% TBE 1X (100V), corado com SYBR Safe e marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas Life Science).

A reação de sequenciamento foi preparada com 2 µL de tampão de sequenciamento (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM Tris-HCl, pH 9), 5 pM iniciador T7, 3 µL da extração plasmidial, 0,4 µL de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) em volume final de 10 µL completado com água ultrapura. O programa de ciclagem para a reação de sequenciamento constou de desnaturação inicial a 96°C por 2 min; 26 ciclos a 96°C por 45 s, 50°C por 30 s e 60°C por 4 min. Antes do sequenciamento a reação foi purificada com 80 µL de isopropanol 65% gelado adicionado em cada poço. A placa ficou em repouso por 15 min, ao abrigo da luz e então centrifugada a 3.000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 180 µL de etanol 70%, seco em temperatura ambiente e local protegido da luz, overnight.

As amostras foram enviadas para o Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, Estado de São Paulo. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático de capilar 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). O produto da reação de sequenciamento foi ressuspensado em 4 µL de formamida deionizada (Hi-Di, Applied Biosystems). No momento do sequenciamento, foi realizada a denaturação das amostras em termociclador, a 90°C por 3 minutos e em

seguida colocadas em gelo por 5 minutos. Após o sequenciamento as sequências obtidas foram processadas pelo 3730/3730xl Data Collection Software versão 3.0 (Applied Biosystems).

### **2.2.5 Sequências Enriquecidas – Identificação e análise de Microssatélites**

O sequenciamento dos clones das sequências de mangueira foram disponibilizados em formato.ab1 e convertidos para o formato FASTA no programa BioEdit versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). O programa CHROMAS versão 2.33 (Technelysium) foi utilizado para verificar a qualidade dos eletroferogramas das sequências e a edição manual foi realizada no programa BIOEDIT versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). Sequências com baixa qualidade foram excluídas. As sequências com boa qualidade foram usadas para identificar microssatélites, o aplicativo utilizado foi o WEBSAT (MARTINS et al., 2009). Os motivos com no mínimo 5 repetições e dinucleotídeo foram anotados.

Segundo Weber (1990) motivos de microssatélites são classificados em relação à organização das repetições: (i) perfeito, quando o motivo não é interrompido por nenhuma base diferente (ex: CTCTCTCTCTCT); (ii) imperfeito, quando há um par de bases diferente do motivo (ex: CTCTCTCTACTCTCT); (iii) interrompido, quando há mais de um par de bases interrompendo as repetições do motivo (ex: CTCTCTGGGACTCTCT); e (iv) composto, quando há dois ou mais motivos distintos adjacentes (ex: CTCTCTCTCTCTGAGAGAGAGAGA).

### **2.2.6 Desenho dos iniciadores de microssatélites de mangueira**

Antes dos desenhos dos iniciadores, as sequências dos adaptadores (*Afa21* e *Afa25*) foram excisadas. O programa PRIMER3 (ROZEN; SKALETSKY, 1999) foi usado no desenho, com os seguintes parâmetros: (1) tamanho do fragmento amplificado variando entre 150 e 250 pb; (2) tamanho entre 18 e 22 pb; (3) temperatura de anelamento entre 57°C a 60°C; (4) variação máxima de temperatura entre *forward* e *reverse* de 3°C; (5) percentual de CG entre 40 a 60%; (6) máxima complementaridade interna de 5 e máxima complementaridade na porção 3'; e (7) exclusão de iniciadores com três ou mais bases adenina ou timina na porção 3'. O programa GENERUNNER versão 3.05 (HASTINGS SOFTWARE

INC., 1994) foi usado para verificar a probabilidade de formação de estruturas secundárias (*hairpins e loops*). Os iniciadores escolhidos para serem sintetizados foram os que apresentaram pouca ou nenhuma probabilidade de ocorrência de estruturas secundárias. (AG inferior a – 2; BRESLAUER et al.; 1986). Após finalizado o desenho, 22 pares de iniciadores foram selecionados para serem sintetizados (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Iniciadores de Microssatélites para manga (*Mangifera indica*)

Loco	Forward	Reverse	Motivo
Mind22	GCATGTTTAATAATATATAGATAA	CTGGGAAGAACAAAGGAT	(AC) <sub>12</sub>
Mind23	CCAAGAAGTCCCTCGTCAT	GAAAGCCAGCATCAGAAAC	(CAG) <sub>4</sub>
Mind24	ACTAAGAGCAAAGTGTGTGTGT	CATGACTCTATCTGGGCAGT	(GT) <sub>8</sub>
Mind25	CGCCGATTCAAACCTCAAG	TAACAACCGCAACGCTTTA	(GT) <sub>9</sub>
Mind26	AAACAGGTGGGTGTGATCC	GCGTTGGTCCCTTCAAGT	(AC) <sub>12</sub>
Mind27	ACCTAGCCTGAGAAATCC	ACAAGGAGGGGAATATGA	(CA) <sub>10</sub> (AT) <sub>5</sub>
Mind28	GCTATACACACACATATAAATAA	CGGGATTAGGTTTTGTGA	(TAAA) <sub>3</sub> (AC) <sub>10</sub>
Mind29	GCCTAACTCTTCGGAAATGG	CTGTCTGTGTGTGGTTGAATGA	(TG) <sub>13</sub>
Mind30	GCAATTTGGGTGTTGGAT	GCGAGAGTGTCTATGCGAG	(CT) <sub>11</sub>
Mind31	AAGAGCCAGAACAGGGAC	GCCTTCCAATTTTATGC	(AC) <sub>16</sub>
Mind32	CCTGATACACAATAAAATAGTAATA	TGACCCTTTGCCTAGCTT	(AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>17</sub>
Mind33	AAGAGCCAGAACAGGGAC	GCCTTCCAATTTTATGC	(AC) <sub>11</sub>
Mind34	GAAGTTTTCTGTGGCAG	AAATAAGGTACGGCGAAT	(TG) <sub>7</sub>
Mind35	CGCCGATTCAAACCTCAAG	GCCACTCCGCAAACCTAAA	(TG) <sub>9</sub>
Mind36	TGGTTTGGTGGGGACATT	GGTGCTTAAAAGATGTTGGTG	(TG) <sub>11</sub>
Mind37	CTCTTCCTAAGTCCCCAA	GTGCCTGTCATTGTTGAA	(GA) <sub>20</sub>
Mind38	GCACAGAAGCACAGAAGTGT	ATTCAACCGACGAAGAGG	(AC) <sub>6</sub> GT(AC) <sub>3</sub> G(CA) <sub>5</sub>
Mind39	ACGGAGAAACAGAGCCA	TCAAGTGAAGCTGAGCAC	(GT) <sub>7</sub> (GA) <sub>3</sub> GG(GA) <sub>10</sub>
Mind40	TCTTTCACAGATTTTCCTGC	TGTGGCAATATGGGATGTC	(TG) <sub>9</sub>
Mind41	CTCATCTTCTGCGACCAA	GTACGTGTTTCTGACTTTCC	(TG) <sub>7</sub> (TG) <sub>15</sub>
Mind42	TTCCCGCTCACCAATTAT	TGGACGATGCTCTTTTCTC	(TA) <sub>5</sub> CATAT(AC) <sub>11</sub>
Mind43	AGCAATCAAGCATCAAGAAT	TCCCACAGTACAAGCACAGA	(AC) <sub>5</sub> AT(AC) <sub>4</sub> G(CA) <sub>4</sub>
Mind44	TGATGGAGAAGTAAATGGATGC	TTGAGTGGAGGTTGAAAAGC	(TAA) <sub>5</sub>

### 2.2.7 Otimização dos iniciadores

Todos os iniciadores foram testados com a mesma concentração. Os reagentes para PCR foram: tampão 1X (Fermentas Life Science); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas Life Science); 0,3 mM de dNTP (Fermentas Life Science); 0,2 µM de

iniciadores *forward* e *reverse*; 1 U Taq polimerase caseira ou Fermentas Life Science e 10ng de DNA; volume final de 20  $\mu$ L. As reações de otimização foram realizadas em termociclador BIO-RAD MyCycler, o programa utilizado para os testes de amplificação dos iniciadores foi específico com desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 33 ciclos a 94°C por 1 min, temperatura de anelamento variando de 65°C até 45°C por 1min (temperatura de anelamento específica para cada reação de teste) e 72°C por 1min; e extensão final a 72°C por 10min.

As amplificações das reações foram visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, TBE 1X (100V), corado com SYBR Safe, os tamanhos dos alelos foram estimados comparado com marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas Life Science). Os produtos das reações foram selecionados quando visualizada uma única banda, com tamanho de alelo aproximado ao desenho prévio do par de iniciadores. Depois foi testado em gel de poliacrilamida 7% com o intuito de observar a existência de polimorfismo nos novos locos.

#### **2.2.8 Gel de poliacrilamida, eletroforese, coloração e genotipagem**

A finalização da otimização dos iniciadores e genotipagem dos 32 acessos de mangueira foi realizada por meio de eletroforese em gel 7% de poliacrilamida desnaturante (CRESTE et al., 2001) com modificações. Após procedimento de preparo do gel e polimerização do mesmo. O gel foi colocado em cuba vertical de eletroforese e foi realizado uma pré-corrida a 70W (150mA e 3.500V) em fonte de alta voltagem (GE), TBE 1X, por 30 min para aquecimento do gel. As amostras foram preparadas com 5  $\mu$ L de reação de PCR e 2,5  $\mu$ L de tampão desnaturante (95% de formamida, 10 mM NaOH, xileno cianol 0,05%, azul de bromofenol 0,05% e 20 mM EDTA) e desnaturadas a 95°C por 5 min e mantidas em gelo até o carregamento no gel. A corrida de eletroforese do gel ocorreu a 70 W em cerca de 4 horas, o tempo de corrida variou dependendo do tamanho do alelo esperado.

Para visualização dos resultados da corrida de eletroforese foi feita a coloração de acordo com Sanguinetti, Dias Nero e Simpson (1994) com modificações. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados com base no padrão molecular 10 bp DNA *Ladder* (Invitrogen).

### 2.2.9 Análise dos locos microssatélites de mangueira

Após a otimização dos marcadores microssatélites calculou-se o PIC (Polymorphic information content) para cada loco. O PIC, descrito por Botstein et al. (1980), é um indicador da qualidade do marcador molecular em estudos genéticos. Segundo a classificação deste autor, marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos, e com valores inferiores a 0,25 pouco informativos.

A estimação das frequências alélicas, o número de alelos por loco ( $A$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foi calculada utilizando o programa PowerMarker v3.25 (LIU, 2006). A heterozigosidade observada é a proporção de indivíduos heterozigóticos nas amostras da população.

## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Extração de DNA do germoplasma de Mangueira

A extração de DNA utilizou um maior percentual de CTAB 3%, NaCl 5% e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,005% proporcionaram um precipitado final com coloração de branco a transparente, com baixa quantidade de polissacarídeos e sem contaminação de compostos fenólicos. Estes compostos fenólicos estão frequentemente presentes em folhas e podem comprometer a qualidade do DNA, o transporte por um período superior a 24 horas e condicionamento não apropriado é um fator que pode comprometer a qualidade do material foliar. Neste caso as folhas passaram mais de 72 horas sofrendo com variações de temperatura que poderiam comprometer a qualidade do DNA no resultado final da extração de DNA. Para efeito ilustrativo, a qualidade e concentração do DNA extraído de 21 cultivares escolhidos aleatoriamente, ainda sem tratamento com *RNAse* podem ser observados na Figura 2.1

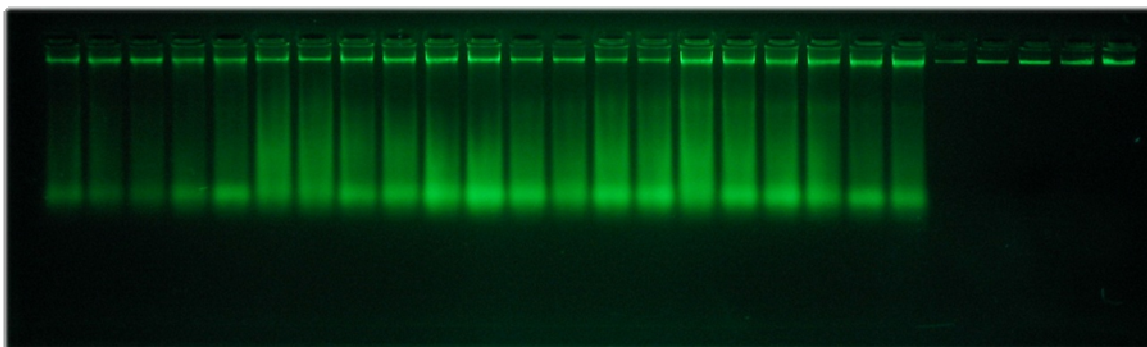


Figura 2.1 - Extração de DNA CTAB 3% de cultivares de mangueira (*Mangifera indica*) do banco de germoplasma da Embrapa Semiárido. A qualidade e concentração do DNA foi comparada com padrões de 25 ng ( $\lambda$ 1), 50 ng ( $\lambda$ 2), 100 ng ( $\lambda$ 3), 150 ng ( $\lambda$ 4), 200 ng ( $\lambda$ 5) de DNA do fago  $\lambda$ , em eletroforese em gel de agarose 1,0%, TBE 1X (120V), corado com SYBr safe

### 2.3.2 Enriquecimento da biblioteca genômica e desenho dos iniciadores

A partir da biblioteca genômica com microssatélites de mangueira construída foram obtidas e sequenciadas 95 colônias. Em apenas 16 colônias não foram encontrados motivos microssatélites. Observa-se o elevado percentual de enriquecimento (75,78%).

Um total de 80 microssatélites foram identificados, sendo que apenas 43 motivos apresentaram microssatélites com tamanho superior a sete repetições e este foram dinucleotídeos (39%), 4 repetições trinucleotídeos (3%) e 4 repetições para hexanucleotídeos (1%). A maioria dos motivos com microssatélites foram dinucleotídeos, seguido de trinucleotídeos e hexanucleotídeos respectivamente (Figura 2.2).



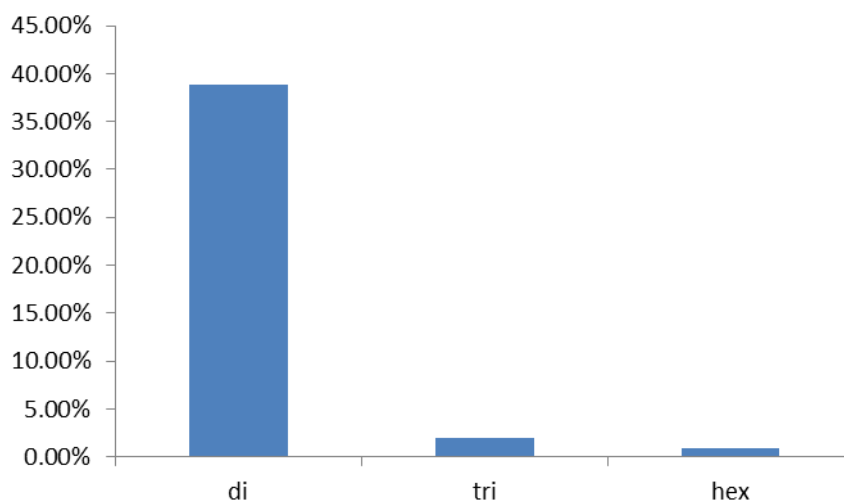


Figura 2.2 – Percentual de motivos de microssatélites encontrados na biblioteca genômica construída para *Mangifera*

Da biblioteca genômica gerada, foram desenhados 23 marcadores SSR apresentados na tabela 2.2, por apresentarem boa qualidade no sequenciamento, bons motivos de microssatélites e viabilidade para o desenho dos iniciadores sem problemas de formação de estruturas secundárias que poderiam atrapalhar a amplificação da PCR referente ao fragmento de microssatélite de interesse.

### 2.3.3 Condição de amplificação e otimização dos iniciadores de microssatélites

Os marcadores desenvolvidos e sintetizados para o presente estudo foram inicialmente testados em diferentes temperaturas de anelamento, com mesma concentração de reagentes e DNA. Isto pode ser observado na Figura 2.3.

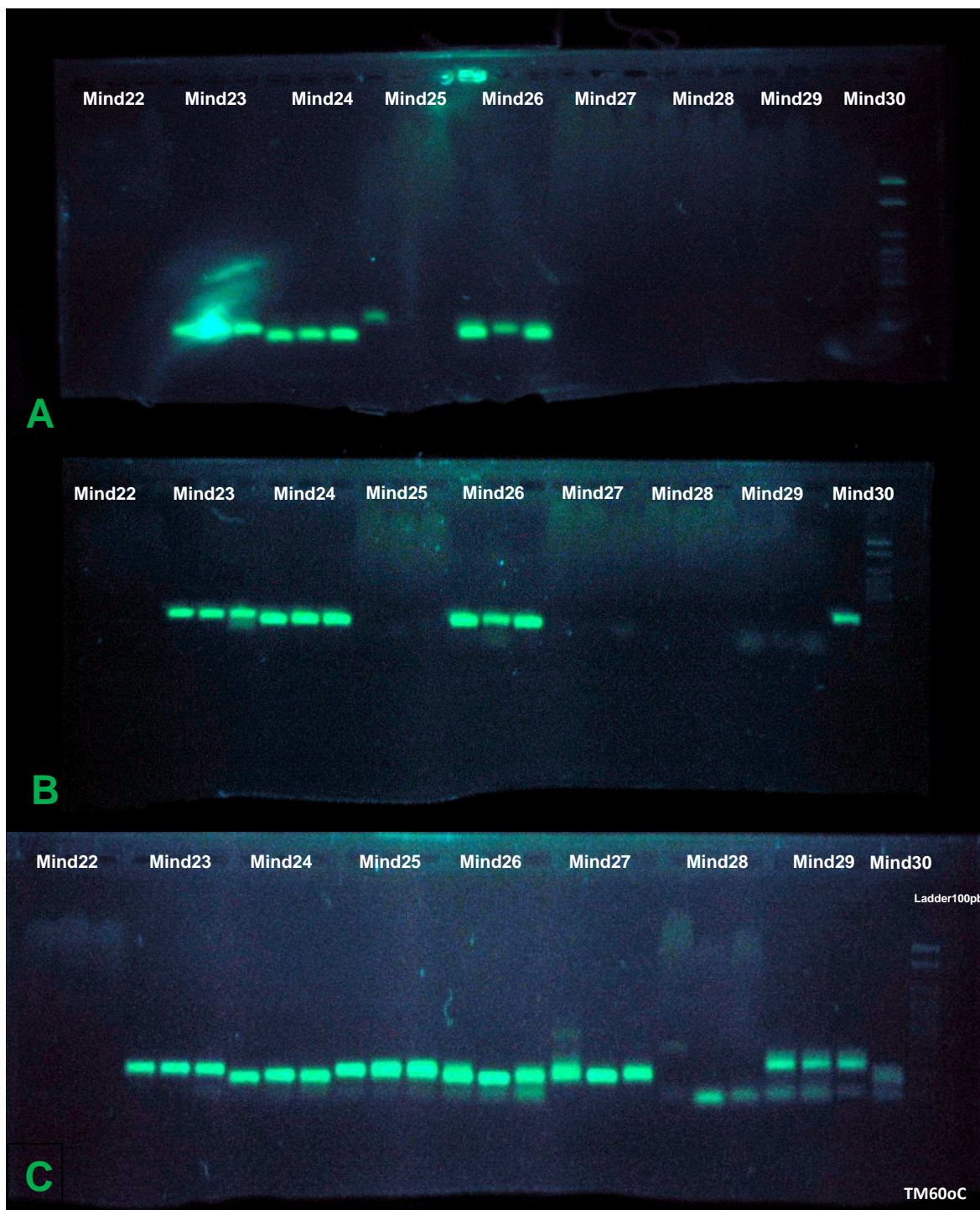


Figura 2.3 – Amplificação com 3 genótipos de mangueira, diferentes temperaturas de anelamento, (A) 64°C, (B) 62°C, (C) 60°C e nove locos (Mind22, Mind23, Mind24, Mind25, Mind26, Mind27, Mind28, Mind29, Mind30)

Pode observar-se com a diminuição da temperatura de anelamento que os locos de microssatélites amplificaram com maior frequência e intensidade. A temperatura de anelamento em que houve maior número de amplificação dos locos de microssatélites foi a  $T_m$  60°C. As amplicações de alguns locos de microssatélites podem ser visualizados na Figura 2.3 e na Tabela 2.2.

#### 2.3.4 Caracterização dos locos microssatélites

Uma população teste contendo 30 variedades de mangueira e mais duas espécies *Mangifera odorata* e *Mangifera foetida* foram usadas para analisar a informatividade dos novos locos e se estes poderiam ser utilizados para a caracterização do Banco de germoplasma de mangueira da Embrapa para estimar o polimorfismo e os parâmetros genéticos (Tabela 2.2). Para os locos foi estimado número médio de alelos por loco, heterozigozidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e PIC.

Um total de 117 alelos foi observado. A média de alelos observados por loco foi de 5,52 com máximo de 8 alelos para o Min31 e apenas os locos Mind23 e Mind38 foram monomórficos. O PIC médio foi 0,621; com ampla variação de 0,165 (Mind34) a 0,792 (Mind36) (Tabela 2.3). Apenas 4 locos foram considerados não informativos ou moderadamente informativos. Isto evidencia a alta qualidade dos locos desenvolvidos e que os mesmos poderão ser usados em estudos genéticos. É importante ressaltar que mesmo os microssatélites pouco informativos podem ser úteis quando utilizados em todo o Banco de germoplasma ou em outras coleções de mangueira.

A heterozigozidade esperada teve média de 0,655 com amplitude de 0,187 para o loco Min34 e 0,820 para o loco Min36. Resultados similares foram observados com locos desenvolvidos por outros autores como DUVAL et al. (2005); VIRUEL et al. (2005); HONSHO et al (2005). Um trabalho mais recente desenvolvido por Ravishankar et al. (2011) disponibilizou 36 novos locos microssatélites. No estudo foi utilizada uma população com 30 cultivares (*Mangifera indica*) e mais 5 espécies diferentes e um total de 313 alelos foram observados. Com média de alelos por loco de 9,2, com máximo de 19 alelos e mínimo de 3 alelos. A média da diversidade gênica foi de 0,728 e PIC médio de 0,687 estes resultados são bem similares com os desenvolvidos no presente trabalho (Tabela 2.3). Pode-se ressaltar

que a Índia é o centro de origem da espécie, sendo esperado haver uma grande variabilidade nos genótipos. E também foram usadas mais cinco espécies de *Mangifera* diferentes e possivelmente, isto eleva a probabilidade de polimorfismo dos locos e consequentemente a média da diversidade gênica e o nível de informação (PIC) dos locos desenvolvidos. No trabalho de Chiang et al. (2012) também desenvolvido na região da Ásia especificamente em Taiwan mais 20 locos foram disponibilizados aos programas de melhoramento genéticos e estudos populacionais de mangueira. Os locos de microssatélites foram testados quanto ao poder informativo e foram observados médias de alelos por loco de 2,68, com diversidade gênica de 0,756 e PIC de 0,525.

Pode-se lembrar de que o Brasil não é centro da origem da espécie. Portanto, os locos desenvolvidos são igualmente ou mais informativos que os disponíveis na literatura. E apresentam qualidade suficiente para serem usados para estimar os parâmetros genéticos do Banco de Germplasma de mangueira da Embrapa.

Os *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Mangifera indica* apresentaram 100% de amplificação quando testados com *Mangifera odorata* e *Mangifera foetida* demonstrando transferibilidade interespecífica dos locos desenvolvidos e podem futuramente ser utilizados para estudos populacionais e melhoramento genético, e utilização de outras espécies de *Mangifera* no melhoramento.

Tabela 2.3 – Parâmetros de diversidade e polimorfismo utilizados para a descrição de locos SSR em Mangueira

Locos	Motivo	Amplitu de alélica (pb)	N de alelos	T(°C)	He	Ho	PIC
Mind22	(AC) <sub>12</sub>	180-190	4	56°C	0,4232	0,3667	0,4463
Mind23	(CAG) <sub>4</sub>	193	1	64°C	0,000	0,000	0,000
Mind24	(GT) <sub>8</sub>	147-163	6	65°C	0,6203	0,1333	0,6122
Mind25	(GT) <sub>9</sub>	182-192	5	60°C	0,7723	0,8667	0,7226
Mind26	(AC) <sub>12</sub>	161-172	5	64°C	0,7395	0,4667	0,6717
Mind27	(CA) <sub>10</sub> (AT) <sub>5</sub>	162-185	6	60°C	0,6927	0,7333	0,6403
Mind28	(TAAA) <sub>3</sub> (AC) <sub>10</sub>	250-258	2	56°C	0,2350	0,2667	0,000
Mind29	(TG) <sub>13</sub>	220-238	5	60°C	0,6831	0,1429	0,6454
Mind30	(CT) <sub>11</sub>	150-170	6	62°C	0,7519	0,8846	0,7302
Mind31	(AC) <sub>16</sub>	252-275	8	60°C	0,8058	0,7931	0,7778
Mind32	(AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>17</sub>	200-222	7	60°C	0,8068	0,3333	0,7791
Mind33	(AC) <sub>11</sub>	255-275	7	60°C	0,8201	0,6071	0,7824
Mind34	(TG) <sub>7</sub>	194-205	3	60°C	0,1876	0,000	0,1658
Mind35	(TG) <sub>9</sub>	202-212	5	60°C	0,7966	0,8333	0,7485
Mind36	(TG) <sub>11</sub>	175-190	7	60°C	0,8237	0,7333	0,7925
Mind37	(GA) <sub>20</sub>	172-200	7	58°C	0,7424	0,6333	0,6806
Mind38	(AC) <sub>6</sub> GT(AC) <sub>3</sub> G(CA) <sub>5</sub>	177	1	60°C	0,000	0,000	0,000
Mind39	(GT) <sub>7</sub> (GA) <sub>3</sub> GG(GA) <sub>10</sub>	208-227	5	60°C	0,7429	0,5667	0,7008
Mind40	(TA) <sub>4</sub> (TG) <sub>9</sub>	212-226	5	60°C	0,7305	0,6667	0,6780
Mind41	(TG) <sub>7</sub> (GA) <sub>15</sub>	190-242	6	64°C	0,8004	0,5517	0,7606
Mind42	(TA) <sub>5</sub> CATAT(AC) <sub>11</sub>	234-270	7	60°C	0,7864	0,4483	0,7420
Mind43	(AC) <sub>5</sub> AT(AC) <sub>4</sub> (CA) <sub>4</sub> (TA) <sub>5</sub>	205-230	7	62°C	0,7424	0,6333	0,6815
Mind44	(TAA) <sub>5</sub>	203-207	2	62°C	0,3254	0,0667	0,2834
Média			5,52		0,6552	0,4966	0,6210

## Referencias

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Report**. New York, v.9, 208-218p, 1991.

BALLY, I.S.E; LU, P.; JOHNSON, P.R. Mango Breeding. In: JAIN MOHAN, S.; PRIYADARSHAN, P.M. (Ed.). **Breeding Platation Tree Crops: Tropical Species**, New York: Springer, 2009. 653p.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, C. Microsatellite – enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Les Ulis, v. 54, p. 277-288, 1999.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNIEK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p. 314-331, 1980.

BRESLAUER, K.J.; RONALD, F.; BLOCKER, H.; MARKY, L.A. Predicting DNA duplex stability from base sequence. **Proceeding of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.83, n.11, p. 3746-3750, 1986.

CHIANG, Y-C.; TSAI, C-M.; CHEN, Y-K H.; LEE, S-R.; CHEN, C-H.; LIN, Y-S.; TSAI, C-C. Development and characterization of 20 new polymorphic microsatellite markers from *Mangifera indica* (Anacardiaceae)<sup>1</sup>. **American Journal of Botany**, Saint Louis, V.99, n.3. p. 177-119, 2012.

DUTECH, C.; AMSELLEM, L.; BILLOTTE, N.; JARNE, P. Characterization of (GA)n microsatellite loci using an enrichment protocol in the neotropical tree species *Vouacapoua americana*. **Molecular Ecology**, Malden, v.9, p. 1433-1449, 2000.

GRUPTA, P. K.; VARSHNEY R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis in bread wheat. **Euphytica**, Wageningen, v.113, p. 163-185, 2000.

HALL, T.A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposiums Series**, Oxford, n.41, p. 95-98, 1999.

HEDRICK, W. Conservation genetics: Where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 16, p.629-636, 2001

HONSHO, C.; NISHIYAMA, K.; EIADTHONG, W.; YONEMORI, K. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango (*Mangifera indica*). **Molecular Ecology Notes**, Maldin v.5, p.152-154, 2005.

KHAN, S.; QURESHI, M.I.; KAMALUDDIN, T.A.; ABDIN, M.Z. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinals plants suitable for RAPD and restriction digestion. **African Journal of Biotechnology**. Nairobi, v. 6, n. 3, p.175-178, 2007.

KRISHNA, H. SINGH, S. K. Biotechnological in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement – A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, p. 223-243, 2007.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. WebSat: a web software for microsatellite marker development. **Bioinformation**, v.3, n.6, p. 282-283, 2009. Disponível em: <http://wsmartins.net/websat> Acesso em: 20 maio 2010.

MUKHERJEE, S. K. **Systematic and ecogeographic studies of crop gene pools**: 1. *Mangifera* Rome: IBPGR Secretariat, 1985. 86p.

PEARKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, p. 1275-1287, 1998.

RAVISHANKAR, K.V.; MANI, B. H.R.; ANAND, L.; DINESH, M. R. Development of new microsatellite markers from mango (*Mangifera indica*) and cross-species amplification. **American journal of Botany**. Saint Louis, v.98, n. 4, p.96-99, 2011.

ROZENAND, S.; SKALETISKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: MISENER, S. KRAWETZ, S.A. (Ed.). **Bioinformatics: methods and Protocols**: Towota, Humana Press, 2000. p. 365-386 (Methods in Molecular Biology, 132).

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NERO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 915-919, 1994.

VIRUEL, M.A.; ESCRIBANO, P.; BARBIERI, M.; FERRI, M.; HORMAZA, J.I. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* L., anacardiaceae) with microsatellites. **Molecular Breeding**, New York, v.15, p. 383-393, 2005.

WEBER, J.L. informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, San Diego, v.7, n.4, p. 524-530, 1990.

### 3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DO BANCO DE GERMOPLASMA BRASILEIRO DE MANGUEIRA

#### Resumo

O conhecimento da diversidade e estrutura genética em espécies frutíferas e perenes em bancos de germoplasma é necessário e importante pelo longo e oneroso processo de melhoramento. O banco de germoplasma da Embrapa Semiárido contém 151 acessos de mangueira que foram estudados com objetivo de estimar a diversidade e estrutura genética molecular e simular a construção de uma coleção nuclear. A caracterização molecular foi realizada com base em 20 locos de microsatélites genômicos e foram detectados 144 alelos, 25 dos quais privados. O número de alelos por marcador variou de 2 a 12, com média de 7,2 alelos. A diversidade gênica média para os acessos foi de 0,689. As análises genéticas classificaram os acessos em dois grupos um formado pelos acessos brasileiros e outro formado pelos novos híbridos e cultivares americanos.

Palavras-chave: *Mangifera indica*; Microsatélites; Manga; Coleção nuclear

#### Abstract

Knowledge of the genetic diversity and structure in germplasm perennial fruit trees is necessary and important for breeding process. The Embrapa Semi-Arid germplasm bank contains 151 landraces of mango. We have studied the mango germplasm to estimate the molecular genetic diversity, structure and also to form a core collection. Molecular results were based on 20 genomic microsatellites loci, and 144 alleles were detected being 25 private alleles. The number of alleles per molecular marker ranged from 2 to 12, with an average of 7.2 alleles. The average gene diversity for mango landraces was 0.689. The genetic analyses divided the mango landraces into two groups. One group was formed by Brazilian cultivars and the other was formed by the new hybrids and Florida cultivars.

Keywords: *Mangifera indica*; Microsatellites; Mango; Core collection

#### 3.1 Introdução

A produção mundial de manga é estimada em 27 milhões de toneladas, e é considerada a segunda fruta tropical mais importante no mundo. A produção dessa fruta é a quinta maior estando atrás apenas de banana, uva, maçã e laranja. A Índia, China, Tailândia, México, Paquistão e Indonésia são responsáveis por mais de 75% da produção mundial da cultura, somente a Índia é responsável por 40% da produção (VIRUEL et al., 2005; BALLY; LU; JOHNSON, 2009). De acordo com



Wyzykowsky et al. (2002) o México, Brasil, Paquistão, Filipinas, Índia e Holanda são responsáveis por quase 70% das exportações mundiais de manga, o México é o principal exportador.

O Brasil é o sétimo maior produtor de manga no mundo com uma produção de 1.546.000 toneladas no ano de 2007 e o primeiro em produtividade por hectare (17 t/ha FAO, 2009). Em 2009 a produção, segundo a Embrapa, foi de 1.197.694 toneladas (EMBRAPA, 2010). As regiões com maior produção são a região Nordeste com 73,41%, seguido pela região Sudeste com 24,83%. É a fruta tropical mais aceita pelo mercado consumido pelo sabor agradável e valor nutricional (DONADIO; FERREIRA, 2002).

Para as cultivares de mangueira verifica-se que a variabilidade genética pode ser observada para caracteres fisiológicos, morfológicos e agrônômicos. Esta é importante em todo o processo de melhoramento genético, que por sua vez, depende da amplitude da base genética disponível, sendo influenciada pelo acervo de recursos úteis disponíveis, na forma de materiais coletados e caracterizados, mantidos nos bancos de germoplasma. A capacidade de acessar esses genótipos portadores de variabilidade, por coleta ou por intercâmbio, é o fator fundamental para o sucesso de qualquer programa de melhoramento genético vegetal (QUEIROZ; LOPES, 2007).

A manga é classificada com base no tipo de desenvolvimento embrionário: a manga monoembriônica apresenta um único embrião produzido por semente, e mangueiras poliembrionicas há a formação de embriões nucelares em que se desenvolvem por superbrotamento e são produzidos na fase de germinação (KNIGHT; SCHNELL, 1994).

Os frutos de mangueira mais cultivados e comercializados internacionalmente tem origem na Florida ou foram derivados destes cultivares. E as cultivares com maior aceitação são Tommy Atkins, Haden, Kent, Keitt e Palmer. O fato desses frutos apresentarem características coloração forte (avermelhados) e vida útil mais longa. Esta ultima característica permite a exportação para todos os continentes do mundo. Outro mercado de interesse e que está se desenvolvendo é a produção para mercados próximos o que viabilizou a produção de cultivares como Carabao das Filipinas e Sindri de origem Paquistanesa; esses frutos são mais perecíveis que os de origem da Florida, mas suportam o transporte regional sem grande perda na qualidade do fruto (BALLY; LU; JOHNSON, 2009).

A caracterização molecular da diversidade genética no germoplasma pode fornecer dados úteis para auxiliar o melhorista na seleção de genitores de populações básicas para estabelecer o programa de melhoramento. Tais populações são formadas pelo cruzamento de materiais superiores, objetivando-se frequentemente a maximização da distância genética com a finalidade de recombinar genes ou complexos gênicos em novas combinações gênicas favoráveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Frankel (1984) a diversidade genética contida nos acessos dos bancos de germoplasma continua a ser um desafio significativo. O conceito de coleção nuclear foi desenvolvido há mais 25 anos para facilitar o acesso à diversidade de uma amostra que possa ser melhor gerenciada e caracterizada antes de voltar a explorar mais amplamente outros genótipos. A lógica das coleções nucleares foi exaustivamente discutida e para muitas espécies levou a subconjuntos de germoplasma contendo três mil acessos ou mais. Na prática, as coleções nucleares com milhares de acessos torna seu uso em programas de melhoramento genético muito trabalhoso e inviável, e como consequência os curadores têm preferido centrar-se em dezenas a centenas de acessos.

A Embrapa Semiárido em parceria com o Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” buscaram estudar o Banco de germoplasma de mangueira Brasileiro. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade, estrutura genética e propor uma coleção nuclear utilizando informações de locos microssatélites.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Material Vegetal**

Foram analisados 150 acessos de mangueira do Banco de germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido e mais um porta enxerto usado nas plantações de mangueira comercial no estado de São Paulo (Tabela 3.1), o BAG é constituído por vários acessos não repetidos vindo de diferentes regiões e países. Para as análises genéticas foram coletadas 6 folhas de cada acesso. Estas foram acondicionadas em freezer -20°C e liofilizadas no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento, do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Após

esta etapa o tecido foliar dos genótipos foi triturado em moinho de faca e armazenado em frascos plásticos devidamente identificados em temperatura ambiente.

Tabela 3.1 - Acessos de Mangueiras do Banco de germoplasma da Embrapa Semiárido utilizados no estudo da diversidade e estrutura genética

(continua)

Nº	Acesso	Embrionia	Origem
1	Ci Proc 06/85	Desconhecida	Brasil
2	Hilda	Pred. Poliembriônica	Brasil
3	Simmonds	Monoembriônica	Florida (USA)
4	Juazeiro III	Monoembriônica	Brasil
5	Kensington	Poliembriônica	Australia
6	Juazeiro VI	Poliembriônica	Brasil
7	Recife	Monoembriônica	Brasil
8	Amrapalli	Monoembriônica	Índia
9	Manga D'água	Poliembriônica	Brasil
10	65	Pred. Poliembriônica	Florida (USA)
11	Mallika	Monoembriônica	Índia
12	Edward	Monoembriônica	Florida (USA)
13	Salitre	Pred. Poliembriônica	Brasil
14	Scuper Many	Monoembriônica	Florida (USA)
15	Dama de Ouro	Monoembriônica	Brasil
16	Smith	Pre. monoembriônica	Florida (USA)
17	Tyler Premier	Monoembriônica	Africa do Sul
18	Juazeiro VII		Brasil
19	Haden 2H	Monoembriônica	Florida (USA)
20	Juazeiro II	Poliembriônica	Brasil
21	CPR	Pred. Poliembriônica	Brasil
22	Surpresa	Poliembriônica	Brasil
23	Pingo de Ouro	Monoembriônica	Brasil
24	Keitt	Monoembriônica	Florida (USA)
25	Haden	Monoembriônica	Florida (USA)
26	Mastruz	Poliembriônica	Brasil
27	Espada Itaparica	Poliembriônica	Brasil
28	Princesa	Pred. Poliembriônica	Brasil
29	Rosary	Poliembriônica	Brasil
30	Kent	Monoembriônica	Florida (USA)

Tabela 3.1 - Acessos de Mangueiras do Banco de germoplasma da Embrapa Semiárido utilizados no estudo da diversidade e estrutura genética

(continuação)			
Nº	Acesso	Embrionia	Origem
31	Maçã	Pre. monoembriônica	Brasil
32	<i>Mangifera odorata</i>		Borneo
33	Santa Alexandrina	Monoembriônica	Brasil
34	Espada 35	Poliembriônica	Brasil
35	Nego não chupa	Monoembriônica	Brasil
36	Imperial II	Desconhecida	Brasil
37	Manguito	Poliembriônica	Brasil
38	Olour	Monoembriônica	Índia
39	Pêssego DPV	Pred. Poliembriônica	Brasil
40	Alice	Monoembriônica	Brasil
41	Papo de Peru II	Desconhecida	Brasil
42	Umbu	Monoembriônica	Brasil
43	Imperial		Brasil
44	Amarelinha	Monoembriônica	Brasil
45	Carlotão	Monoembriônica	Brasil
46	R2E2	Poliembriônica	Brasil
47	Joa	Pred. Poliembriônica	África do Sul
48	Juazeiro IV	Poliembriônica	Brasil
49	Maya	Monoembriônica	Israel
50	Celebration	Desconhecida	Austrália
51	Langra	Monoembriônica	India
52	Néldica	Pred. Poliembriônica	África do Sul
53	Ruby	Monoembriônica	Florida (USA)
54	Florigon	Monoembriônica	Florida (USA)
55	Calmon	Monoembriônica	Filípinas
56	Eldon	Monoembriônica	Florida (USA)
57	Haden rosa	Monoembriônica	Brasil
58	Ametista	Pred. poliembriônica	Brasil
59	BRS-Ômega	Pred. Poliembriônica	Brasil
60	Alphonso	Monoembriônica	India

Tabela 3.1 - Acessos de Mangueiras do Banco de germoplasma da Embrapa Semiárido utilizados no estudo da diversidade e estrutura genética

(continuação)			
Nº	Acessos	Embrionia	Origem
61	Bhadauram	Desconhecida	Índia
62	Pingo de Ouro DPV	Monoembriônica	Brasil
63	Irwin	Monoembriônica	Florida (USA)
64	Black Java	Poliembriônica	Austrália
65	Lita	Monoembriônica	Brasil
66	Coração Magoado	Pred. Poliembriônica	Brasil
67	Heidi	Monoembriônica	África do Sul
68	M-13269	Monoembriônica	Brasil
69	Rosa	Poliembriônica	Brasil
70	Caxangá	Poliembriônica	Brasil
71	Bonita	Pred. Poliembriônica	Brasil
72	Primor de Amoreira	Poliembriônica	Brasil
73	Espada Ouro	Pred. Poliembriônica	Brasil
74	Comprida roxa	Monoembriônica	Brasil
75	Parwin	Monoembriônica	Florida (USA)
76	Palmer	Monoembriônica	Florida (USA)
77	Morais	Pred. Poliembriônica	Brasil
78	Tommy Atkins	Monoembriônica	Florida (USA)
79	Chené	Monoembriônica	África do Sul
80	Duncan	Pred. Monoembriônica	Florida (USA)
81	Alfa	Desconhecida	Brasil
82	Beta	Desconhecida	Brasil
83	Malindi	Pred. Poliembriônica	África do Sul
84	Espada Manteiga	Pred. Poliembriônica	Brasil
85	Extrema	Pred. Monoembriônica	Brasil
86	Pêssego	Desconhecida	Brasil
87	Espada	Pred. Poliembriônica	Brasil
88	Torbet	Pred. Poliembriônica	Florida (USA)
89	Momi-K	Monoembriônica	Florida (USA)
90	Juazeiro V	Desconhecida	Brasil

Tabela 3.1 - Acessos de Mangueiras do Banco de germoplasma da Embrapa Semiárido utilizados no estudo da diversidade e estrutura genética

(continuação)			
Nº	Acesso	Embrionia	Origem
91	Manilla	Pred. Poliembriônica	Filípinas
92	Manzanillo	Pred. Monoembriônica	Mexico
93	<i>Mangifera similis</i>	Desconhecida	Tailândia
94	Ipuçaba	Pred. Monoembriônica	Brasil
95	<i>Mangifera foetida</i>		Tailândia
96	Foice	Poliembriônica	Brasil
97	Espada vermelha	Pred. Poliembriônica	Brasil
98	Mona Mon_DCG407	Desconhecida	Brasil
99	Himba		Brasil
100	Zill	Monoembriônica	Florida (USA)
101	Winter	Monoembriônica	Florida (USA)
102	Itamaracá	Monoembriônica	Brasil
103	Bourbon	Monoembriônica	Brasil
104	Apple DCG	Poliembriônica	Tailândia
105	Brasil	Poliembriônica	Brasil
106	Ataulfo	Poliembriônica	Mexico
107	Ômega	Desconhecida	Brasil
108	Da porta	Monoembriônica	Brasil
109	Dashehari	Monoembriônica	Índia
110	Van Dyker	Monoembriônica	Florida (USA)
111	Ubá	Pred. Poliembriônica	Brasil
112	Carabão	Pred. Poliembriônica	Filipinas
113	Papo de Peru I	Poliembriônica	Brasil
114	Chino	Pred. Poliembriônica	Brasil
115	Favo de Mel	Monoembriônica	Brasil
116	CPAC 07/66-86	Desconhecida	Brasil
117	CPAC 10/2786	Desconhecida	Brasil
118	CPAC 10/4486	Desconhecida	Brasil
119	CPAC 09/137-86	Desconhecida	Brasil
120	Itiúba	Poliembriônica	Brasil

Tabela 3.1 - Acessos de Mangueiras do Banco de germoplasma da Embrapa Semiárido utilizados no estudo da diversidade e estrutura genética

(conclusão)			
Nº	Acesso	Embrionia	Origem
121	CPAC 71/86	Desconhecida	Brasil
122	CPAC 16/94	Desconhecida	Brasil
123	CPAC 225/94	Desconhecida	Brasil
124	CPAC 263/94	Desconhecida	Brasil
125	CPAC 22/93	Desconhecida	Brasil
126	CPAC 11136/93	Desconhecida	Brasil
127	CPAC 165/93	Desconhecida	Brasil
128	CPAC 136/86	Desconhecida	Brasil
129	CPAC 140/86	Desconhecida	Brasil
130	Manga Verde	Desconhecida	Brasil
131	Rosa 46	Desconhecida	Brasil
132	Espada Rosa	Desconhecida	Brasil
133	Mona Mon II	Desconhecida	Brasil
134	CPAC 93/86	Desconhecida	Brasil
135	Ouroporanga	Desconhecida	Brasil
136	Boarolo	Desconhecida	Brasil
137	Chinesa (Tinfan)	Desconhecida	Brasil
138	Doce Leite	Desconhecida	Brasil
139	Rosa 36	Desconhecida	Brasil
140	Natalina	Desconhecida	Brasil
141	Manga Preta	Desconhecida	Brasil
142	Lira	Desconhecida	Brasil
143	Azenha	Desconhecida	Brasil
144	Berton	Desconhecida	Brasil
145	Carlotinha	Desconhecida	Brasil
146	Espada Vermelha	Desconhecida	Brasil
147	Coquinho	Desconhecida	Brasil
148	Ribeiro	Desconhecida	Brasil
149	Rosa 2	Desconhecida	Brasil
150	Roxa	Desconhecida	Brasil
151	Porta enxerto	Desconhecida	Brasil



### 3.2.2 Genotipagem da população de mangueira

Inicialmente foram realizadas as extrações de DNA com método CTAB 3% (KHAN et al., 2007). As concentrações dos DNAs extraídos foram estimadas em eletroforese em gel de agarose 1% comparados com DNA do fago Lambda de concentração conhecidas. E em seguida, os DNAs foram diluídos para concentração de 10ng/μl. Os locos de microssatélites foram desenvolvidos no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da ESALQ/USP e selecionados baseados no valor do PIC (*Polymorphism information content*) para cada loco.

As reações de amplificação dos locos foram conduzidas em volume final de 20 μl. Contendo tampão 1X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM de dNTP, 0,2 μM de iniciadores *forward* e *reverse*; 1 U Taq polimerase caseira ou *Fermentas Life Science* e 10ng de DNA molde. O programa utilizado para os testes de amplificação dos iniciadores foi específico com desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 33 ciclos a 94°C por 1 min, temperatura de anelamento variando de 65°C até 45°C por 1min (temperatura de anelamento específica para cada reação de teste) e 72°C por 1min; e extensão final a 72°C por 10min.

Os produtos das reações foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% com 7M de uréia para detectar o polimorfismo dos locos de microssatélites. Os tamanhos dos alelos foram estimados comparando marcador de peso molecular ladder de 10 pb.

#### Análise dos dados

O programa PowerMarker foi utilizado para estimação da diversidade genética: número de alelos por loco, frequência alélica, diversidade gênica, heterozigotidade e PIC (LIU; MUSE, 2005). Os alelos privados foram estimados pelo programa GDA (LEWIS, ZAYKIN, 2002). O calculo da matriz de distância genética de Rogers modificada por Wright (1978) (Rogers-W) foi realizada no programa NTSYSpc (ROHLF, 2000), em seguida, realizou-se a construção do dendrograma pelo método de agrupamento *Neighbor Joining*. Foi utilizado o programa *DARwin* para construção do dendrograma e testar a estabilidade dos agrupamentos por meio de 10.000 reamostragens bootstrap (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006).

A análise de coordenadas principais (PCoA) construída com a matriz identidade com o auxílio dos subprogramas DCENTER, EIGEN e MXPLOT do programa NTSYS-pc (ROHLF, 2000).

O programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) realizou a análise de estrutura populacional entre os acessos. Os parâmetros utilizados foram burn-in de 300.000 seguido por 500.000 iterações, no modelo *no admixture* com frequências alélicas independentes. Os valores de K de 1 a 10 foram testados, com 20 iterações independentes para cada agrupamento. A determinação do número K mais provável foi realizado utilizando o método de Evanno, Regnaut e Goudet (2005).

A simulação da amostragem da coleção nuclear foi obtida por meio do programa PowerCore descrito por Kim et al. (2007) em que foi utilizada uma estratégia M implementada através de um algoritmo heurístico modificado para maximizar o número de alelos detectados por marcadores moleculares. O PowerCore também estimou os índices de diversidade de Shannon Weaver e de Nei para cada marcador molecular na coleção original e na coleção nuclear. Em seguida, a coleção nuclear foi comparada com a coleção original para avaliar a sua representatividade.

### **3.3 Resultados e Discussão**

#### **3.3.1 Caracterização molecular**

Para estimar a diversidade e estruturação genética foram utilizados 20 locos de microssatélites analisados previamente. Dois locos monomórficos (Mind23 e Mind38) foram descartados e o loco Mind28 foi rejeitado por apresentar problemas de amplificação quando utilizados nos 151 genótipos.

Considerando-se os 151 acessos de mangueira (150 acessos da Embrapa Semiárido mais um porta enxerto usado na região produtora do Estado de São Paulo), foi observado um total de 144 alelos no total (tabela 3.2). O loco com maior número de alelos foi o Mind32 com 12 alelos e o com menor número foi o Mind44 com apenas dois alelos. A frequência alélica para o conjunto dos cultivares de mangueira variou entre 0,003 a 0,912 (tabela 3.2), os locos Mind34, Mind44 e o Mind22 apresentaram maiores frequências alélicas 0,912 (1:0,912), 0,832 (1:0,832)

e 0,667 (1:0,667) respectivamente, essa proporção demonstra grande probabilidade de fixação dos alelos presentes no BAG.

Tabela 3.2 – Frequência alélica para o Banco de Germoplasma de mangueira (*Mangifera indica*)  
(continua)

Loco	Alelo	N	Frequência alélica
Mind22	180	149	0,077
	182		0,047
	185		0,097
	190		0,667
	193		0,111
Mind24	145	146	0,044
	147		0,113
	149		0,003
	150		0,024
	152		0,052
	157		0,048
	159		0,517
Mind25	163	146	0,198
	180		0,014
	182		0,253
	185		0,175
	188		0,356
	190		0,096
	192		0,106
Mind26	158	148	0,003
	160		0,007
	162		0,355
	164		0,074
	169		0,307
	170		0,247
	190		0,003
	193		0,003
Mind27	160	137	0,073
	162		0,179
	164		0,387
	166		0,022
	170		0,266
	174		0,003
	178		0,120
	185		0,015
Mind29	218	142	0,023

Tabela 3.2 – Frequência alélica para o Banco de Germoplasma de mangueira (*Mangifera indica*)  
(continuação)

Loco	Alelo	N	Frequência alélica
Mind30	220	141	0,057
	224		0,193
	230		0,303
	234		0,140
	238		0,227
	252		0,057
	145		0,007
	150		0,145
	155		0,028
	158		0,078
	160		0,280
	163		0,057
	165		0,227
	168		0,046
Mind31	170	146	0,131
	252		0,007
	260		0,294
	262		0,109
	264		0,103
	268		0,072
	270		0,336
	275		0,034
Mind32	280	150	0,044
	188		0,007
	190		0,050
	200		0,197
	204		0,113
	208		0,273
	210		0,237
	212		0,050
	222		0,027
	230		0,007
	238		0,003
	245		0,023
	262		0,013
Mind33	248	139	0,040

Tabela 3.2 – Frequência alélica para o Banco de Germoplasma de mangueira (*Mangifera indica*)  
(continuação)

Loco	Alelo	N	Frequência alélica
Mind34	255	142	0,227
	257		0,140
	261		0,147
	267		0,140
	269		0,245
	271		0,050
	275		0,011
	192		0,003
	194		0,912
	200		0,042
Mind35	205	146	0,039
	220		0,003
	202		0,260
	206		0,137
	208		0,349
Mind36	210	144	0,130
	212		0,123
	165		0,003
	175		0,233
	178		0,191
	182		0,104
	184		0,024
	188		0,108
	190		0,271
	192		0,049
Mind37	200	146	0,010
	202		0,007
	172		0,143
	176		0,029
	178		0,412
	183		0,007
	186		0,015
	198		0,191
	200		0,169
	202		0,033

Tabela 3.2 – Frequência alélica para o Banco de Germoplasma de mangueira (*Mangifera indica*)

(continuação)			
Loco	Alelo	N	Frequência alélica
Mind39	202	145	0,007
	208		0,107
	210		0,262
	212		0,207
	216		0,124
	223		0,014
	227		0,279
Mind40	200	150	0,007
	212		0,407
	216		0,337
	218		0,090
	226		0,150
	228		0,010
Mind41	190	146	0,048
	200		0,007
	227		0,349
	230		0,216
	232		0,003
	234		0,082
	238		0,003
	242		0,291
Mind42	234	149	0,018
	236		0,129
	248		0,115
	250		0,036
	259		0,464
	261		0,201
	270		0,036
Mind43	205	147	0,136
	212		0,292
	217		0,014
	221		0,007
	223		0,425
	227		0,041
	230		0,085

Tabela 3.2 – Frequência alélica para o Banco de Germoplasma de mangueira (*Mangifera indica*) (conclusão)

Loco	Alelo	N	Frequência alélica
Mind44	203	143	0,168
	207		0,832
Numero total de alelos	144		
Número e proporção de alelos privados	25 17,36%		

### 3.3.1.1 Alelos privados

O percentual de alelos privados foi de 17,36% equivalente a 25 alelos estimados pelos 151 acessos de mangueira (Tabela 3.2). Foram encontrados alelos privados em 15 dos 20 locos microssatélites genômicos utilizados no estudo (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – alelos privados dos 151 acessos de mangueira

Marcadores	Alelos	Acessos
Mind24	149	Manga D'agua
Mind25	180	Brasil, Rosa
Mind26	158, 161, 190 e 193	CPAC10/4486(dois alelos), CPR, Black Java
Mind 27	174	Tyler premier
Mind29	252	CPAC10/4486, Rosa36, Rosa02, Rosa, Foice
Mind30	145	<i>Mangifera foetida</i>
Mind32	188, 230 e 238	<i>Mangifera similis</i> , Haden2H, Manga verde
Mind34	192 e 220	<i>Mangifera similis</i> , Bhadariuam, Amrapalli
Mind36	165, 200 e 202	<i>M. foetida</i> , Comprida roxa, Beta, CPAC11136/93
Mind37	176	Juazeiroll, CPR, Papo de peru II, Umbu, JuazeirolV, Porta enxerto
Mind39	202	<i>M. similis</i>
Mind40	200	<i>M. foetida</i>
Mind41	200, 232 e 238	Edward, BRS-Ômega, Maçã
Mind42	270	Salitre, CPR, Extrema, Papo de peru I, Rosa36
Mind43	221	CPAC 22/93



O loco microssatélite que identificou o maior número de alelos privados foi Mind26 com 4 alelos e esses alelos estão presente em três acessos (CPR, Black Java e CPAC10/4486). Dentre os acessos que apresentaram o maior número de alelos privados foram CPR e o CPAC10/4486 com três alelos para os locos (Mind26, Mind37 e Mind42) e dois alelos para os locos (Mind26, Mind29), respectivamente. As espécies *M. similis* e *M. foetida* também apresentaram 3 alelos privados cada (Tabela 3.3). Os locos de microssatélites que apresentaram apenas um alelo privado e compartilhou com maior número de acessos foi o loco Mind37 com 6 acessos; outros locos que compatilharam um único alelo com vários acessos foram os locos Mind29 e Mind42 com 5 acessos e o Mind36 com 4 acessos cada. O loco Mind29 compartilhou o mesmo alelo com os acessos Rosa, Rosa2 e o Rosa 36; possivelmente, esse compartilhamento de alelos privados entre os acessos do grupo com nome Rosa pode indicar alto grau de parentesco entre os acessos, sendo também muito importante preservar o alelo que apenas está presente no acesso Rosa.

Para o melhoramento genético é primordial a manutenção da diversidade genética nos bancos de germoplasma. Então, se faz necessária a manutenção dos alelos de alta frequência porque estes possivelmente são mais adaptados ou podem estar ligados a caracteres importantes selecionados previamente. E também, não menos importante é interessante manter os alelos com menor frequência ou raros. Estes alelos são essenciais para manter a riqueza dos programas de melhoramento e representam um potencial de genes para estresses bióticos ou abióticos em um futuro próximo.

### 3.3.1.2 Diversidade genética

A diversidade gênica para todos os acessos variou entre 0,165 a 0,823 com média de 0,689 (Tabela 3.4). Este resultado comparado com os trabalhos do grupo de Hirano, Oo, Watanab (2010) em que a diversidade gênica foi de 0,645 pode ser explicada pela coleção de mangueira do Brasil possuir significativa riqueza alélica por apresentar acessos de diferentes origens ou o maior tamanho da população de mangueira brasileira estudada favorecer as estimativas do germoplasma nacional (Brasil 151 acessos e Myanmar 96 acessos). Uma característica relevante é a poliembrionia e Myanmar é considerada centro de

origem de mangueiras poliembrionicas. Mangueiras com esta caracterísca podem apresentar uma menor diversidade gênica.

O banco de germoplasma de mangueira da Embrapa apresentou um índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ) entre -0,026 a 0,801 (Tabela 3.4) demonstrando que dos 20 locos apenas o loco Mind30 apresentou elevado número de acessos heteorozigotos. Outros seis locos apresentaram excesso de homozigotos. Isto pode correr com frequência em populações artificiais como bancos de germoplasma que ao longo do tempo vão perdendo alelos pelo direcionamento do programa de melhoramento ou a inadequada conservação do mesmo.

Com frequência populações de mangueiras ou cultivares tendem a ter locos em homozigose, e Viruel et al. (2005) comentam em seu trabalho que em manga o contrário poderia ocorrer pelo motivo da cultura apresentar polinização aberta e os cruzamentos serem aleatórios e o índice de fixação não seria diferente de zero ou tenderia a ter uma maior presença de heterozigotos ou locos em heterozigose. O excesso de locos em homozigose pode estar ocorrendo pela maioria dos acessos de origem brasileira serem de origem poliembrionica. Outro provável fator é que estes acessos não passaram por seleção e/ou cruzamentos.

Os 151 acessos de mangueira apresentaram valor médio de PIC (0,655) e o número médio de alelos por loco (7,2) (Tabela 3.4), comparando estes valores com o trabalho desenvolvido por Schnell et al. (2006), avaliaram um conjunto de 208 cultivares dividido e 4 grupos com 25 microssatélites e obtiveram um valor médio de PIC de 0,552 e número médio de 6,96 de alelos por loco. Em outra pesquisa realizada Hirano, Htun Oo, Watanab (2010) avaliaram um grupo de 96 cultivares com 11 locos de microssatélites e relatam que os valores médio obtidos foram PIC de 0,706 e 7,55 alelos por loco. Demonstrando que os conjuntos de locos de microssatélites desenvolvidos para o banco de germoplasma brasileiro de mangueira tem elevado poder informativo para estudos populacionais seja em populações naturais, pré-melhoramento ou melhoramento. Esses resultados podem indicar que o Brasil mesmo não sendo centro de origem da espécie apresenta uma riqueza alélica satisfatória até o momento.

Tabela 3.4 – Parâmetros genéticos utilizados para analisar a diversidade do banco de gemoplasma de mangueira. N (número de alelos), (GD) diversidade gênica, ( $H_o$ ) heterozigosidade, PIC (conteúdo de informação polimórficas), (f) índice de fixação

Loco	N de alelos	GD	$H_o$	PIC	f
Mind22	5	0,525	0,423	0,497	0,196
Mind24	8	0,673	0,219	0,639	0,676
Mind25	6	0,758	0,739	0,720	0,027
Mind26	8	0,713	0,446	0,659	0,378
Mind27	8	0,732	0,686	0,689	0,066
Mind29	7	0,793	0,167	0,762	0,791
Mind30	9	0,819	0,844	0,796	-0,026
Mind31	8	0,769	0,623	0,737	0,193
Mind32	12	0,811	0,420	0,786	0,485
Mind33	8	0,823	0,504	0,799	0,391
Mind34	5	0,165	0,077	0,159	0,533
Mind35	5	0,759	0,746	0,722	0,020
Mind36	10	0,810	0,583	0,784	0,283
Mind37	8	0,742	0,647	0,707	0,132
Mind39	7	0,783	0,510	0,749	0,352
Mind40	6	0,690	0,607	0,635	0,125
Mind41	8	0,737	0,726	0,693	0,019
Mind42	7	0,711	0,288	0,676	0,598
Mind43	7	0,706	0,537	0,660	0,242
Mind44	2	0,279	0,056	0,240	0,801
Média	7,2	0,689	0,492	0,655	0,289

Comparando-se os resultados obtidos com o trabalho de Viruel et al. (2005) em que avaliaram 28 acessos, contendo 17 cultivares americanas, utilizando 16 locos microssatélites, observa-se semelhança nas estimativas encontradas, ou seja, no trabalho citado encontrou-se diversidade gênica de 0,690 e 5,3 alelos por loco.

Durval et al. (2009) numa escala regional avaliaram mangueiras caribenhas. A população de estudo foi composta por 304 acessos incluindo variedades das Antilhas francesas, africanas, americanas e caribenhas, sendo utilizado 19 locos microssatélites. Neste estudo foi possível identificar que dos 304 acessos, 207 eram diferentes e as demais eram réplicas. Observando apenas o grupo formado pelos acessos caribenhos, a diversidade gênica foi de 0,52, considerada alta e podendo ser explicada pelos centros de origem. Estes acessos

Caribenhos tem origem indiana e são monoembriônicas e possivelmente, é o motivo da alta diversidade gênica.

No caso do Brasil os acessos são compostos por duas populações predominantes: a brasileira com 102 acessos, a americana com 23 acessos e mais 26 acessos provenientes (Índia, Israel, África do Sul, Austrália, México, Tailândia e Filipinas) além de três espécies do gênero *Mangifera* (*M. odorata*, *M. similis*, e *M. foetida*). E estas magueiras brasileiras foram introduzidas em dois momentos: a primeira introdução foi realizada pelos portugueses com predominância de acessos poliembriônicos e a segunda por melhoristas com acessos monoembriônicos com características mais apreciadas pelo mercado. Essa segunda introdução teve a finalidade de melhorar a qualidade dos cultivares e aumentar a variabilidade genética.

### **3.3.2 Análise da Estrutura e Diversidade Genética de Mangueira**

As análises de estrutura populacional foram realizadas através de um teste de atribuição de indivíduos a grupos (k). Utilizando o programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) os 151 genótipos foram analisados com 20 iterações e foram estimados 1 até 10 grupos (k). A estatística  $\Delta K$  de Evanno, Regnaut e Goudet (2005) apresentou o pico de  $K = 2$  como sendo o mais provável, dividindo o banco de germoplasma em dois subgrupos relacionados (Figura 3.1). Como todo o banco foi analisado para saber como se apresentava a estrutura genética do BAG, nas análises permaneceram os três acessos de espécies diferentes *Mangifera odorata*, *M. similis*, *M. foetida* para estimar como se apresenta a estruturação da população do Banco de germoplasma existente no Brasil.

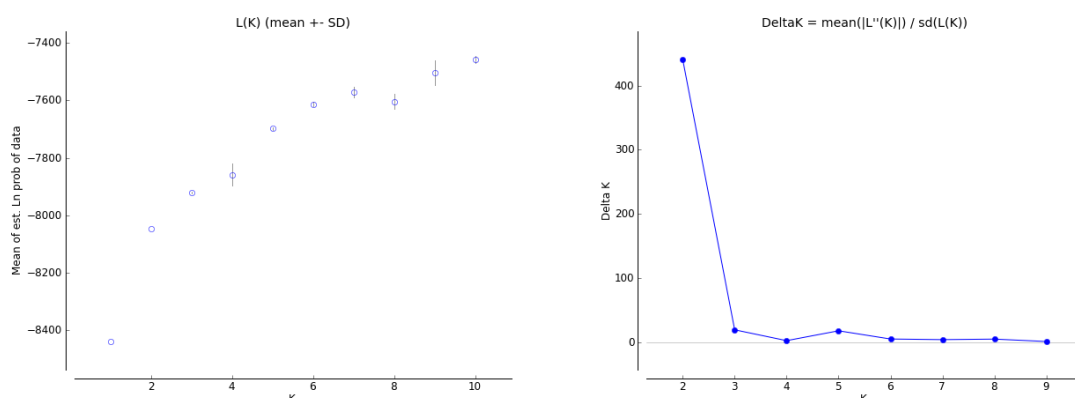


Figura 3.1 – Valores médios de: a) LNP(D) de Pritchard et al. (2000) e b)  $\Delta K$  de Evanno et al. (2005) para 20 repetições de simulações no programa Structure com K de 1 a 10 para os 151 acessos do Banco de germoplasma da Embrapa.

A primeira subpopulação reuniu a maioria das cultivares comerciais principalmente as norte americanas originadas da Florida e são as mais aceitas pelo mercado consumidor (Figura 3.2). Estas cultivares são responsáveis pela segunda introdução de genótipos no Brasil. Dentre as cultivares estão: Tommy Atkins, Winter, Keitt, Van Dyke, Ruby, Palmer, Edward, Kent, Harden, Forigon e na mesma subpopulação pode ser observado que os acessos da Embrapa ficaram alocados no mesmo conjunto (CPAC165/93, CPAC93/86, CPAC09/137-86, CPAC16/94, CPAC71/86, CPAC225/94, CPAC10/2786, CPAC11136/93, CPAC263/94, CPAC22/93, CPAC10/4486, CPAC140/86, CPAC07/66-86). Isso ocorreu, provavelmente, porque estes novos híbridos tem um dos genitores norte americano. Dentre os híbridos que agruparam o CPAC165/93, CPAC263/94 e o CPAC22/93 apresentam qualidades requeridas pelos programas de melhoramento e mercado consumidor. Os acessos CPAC165/93 e o CPAC263/94, em análises realizadas por Pinto, Rossetto, Faleiro (2005), mostraram alto rendimento de polpa com 82,9%, e 88,2%, respectivamente, superando entre 10 e 18% o rendimento da cultivar Tommy Atkins. O híbrido CPAC263/94 também apresentou coloração de casca vermelha e da polpa amarelo escuro, bastante macia sem fibras, bom sabor sendo muito atrativo para o mercado consumidor do fruto fresco. O CPAC22/93 apresentou características desejadas como ausência de colapso interno da polpa, excelente qualidade de polpa e sabor.

Outro fato importante na análise populacional foi que os acessos de *Manifera odorata*, *M. similis* e *M. foetida* agruparam no mesmo conjunto de acessos da subpopulação 1 (Figura 3.2). As variedades brasileiras bem conhecidas e que

foram alocadas no mesmo grupo são a Coquinho que apresenta sabor apreciado pela população e a cultivar Espada vermelha desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas apresenta coloração parecida com as cultivares norte-americanas, e é recomendada como copa, pois apresenta alta resistência a mosca das frutas e como porta enxerto porque é resistente a duas raças do patógeno *Ceratocystis fimbriata* causador da seca da mangueira (Rossetto et al., 1996).

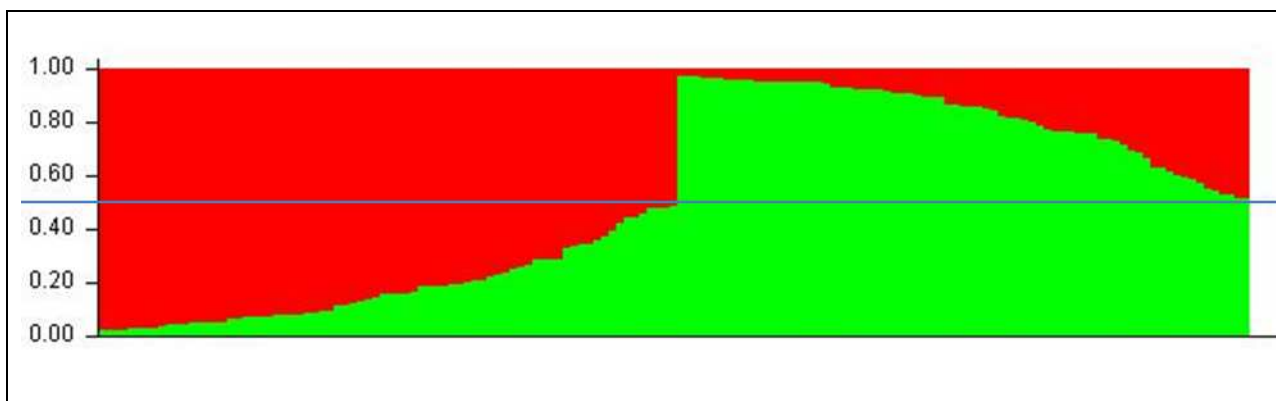


Figura 3.2 – Análise da estrutura populacional para o valor  $K=2$  mais provável, subpopulação 1 composta por acessos norte americanos e novos híbridos nacionais e subpopulação 2 composta em sua maioria pelos acessos de origem brasileira

Na segunda subpopulação a maioria dos acessos foi de origem brasileira. Estes acessos presentes nessa subpopulação provavelmente em sua maioria foram introduzidos pelos portugueses e ficou conhecida como a primeira introdução da espécie no Brasil. E estes acessos ao longo dos anos foram sendo produzidos em pequenas áreas e fazendas sem valor comercial. Dentre os acessos as mais conhecidas são os frutos com nome de Rosa, Espada, Coração magoado, Carlotão e Carlotinha e são produzidas em pequenas propriedades e/ou pequenos produtores e consumidas por mercados regionais. A produção desses frutos de manga com frequência não apresentam organização na cadeia produtiva e consequentemente, falta controle de qualidade dos frutos. O mais importante desses cultivares para a cadeia produtiva e uso em programas de melhoramento é a adaptabilidade que estes cultivares vem adquirindo ao longo dos anos. Duas características negativas não apreciadas pelos consumidores do fruto inatura, e frequentemente presentes nos acessos brasileiros referem-se a presença de elevada quantidade de fibras na polpa e valor de brix considerado baixo. O inverso dessas características citadas acima são características consideradas importantes na cadeia produtiva do fruto de mesa.

A subpopulação dois apresentou ainda seis cultivares da Florida (Eldon, Duncan, Parwin, Zill, 65 e Irwin) que agruparam com os acessos brasileiros. Estas cultivares podem apresentar o conjunto genômico como maior percentual de homologia com os acessos brasileiros. As cultivares Eldon e Zill são filhas da Haden por meio de polinização aberta e provavelmente os genitores apresentam características mais similares com os acessos brasileiros ou o poder de combinação entre os progenitores não era satisfatório para gerar uma progênie superior.

### **3.3.3 Análises da distância genética e agrupamento**

As análises baseadas em distância genética de Roger-W modificada e agrupamento Neighbor Joining, permitiram identificar dois grupos entre os 151 acessos avaliados. Um grupo foi formado pelos cultivares comerciais, novos híbridos da Embrapa e 13 cultivares de outros países. Podendo ser observado a consistência dos resultados obtidos pela análise da estrutura da população no programa STRUCTURE, que apresentou consistência quando comparado com os resultados do agrupamento baseado na distância genética e permitiu a observação de grupos similares ao formado no agrupamento (Figura 3.3).

O segundo grupo foi formado em sua maioria pelos acessos brasileiros. Quatro cultivares da Florida (Tommy Atkins, 65, Duncan e Eldon) agruparam na parte intermediária do segundo grupo. A Tommy Atkins agrupou próximo de acessos (Chino, Mallika, Amrapalli, Langra e Tyler Premier) oriundos da Índia e África do Sul respectivamente. A formação desse grupo pode ser explicado pelo fato dos cultivares americanos terem sido formados por mangueiras de origem indiana (PINTO, FERREIRA, 2004).

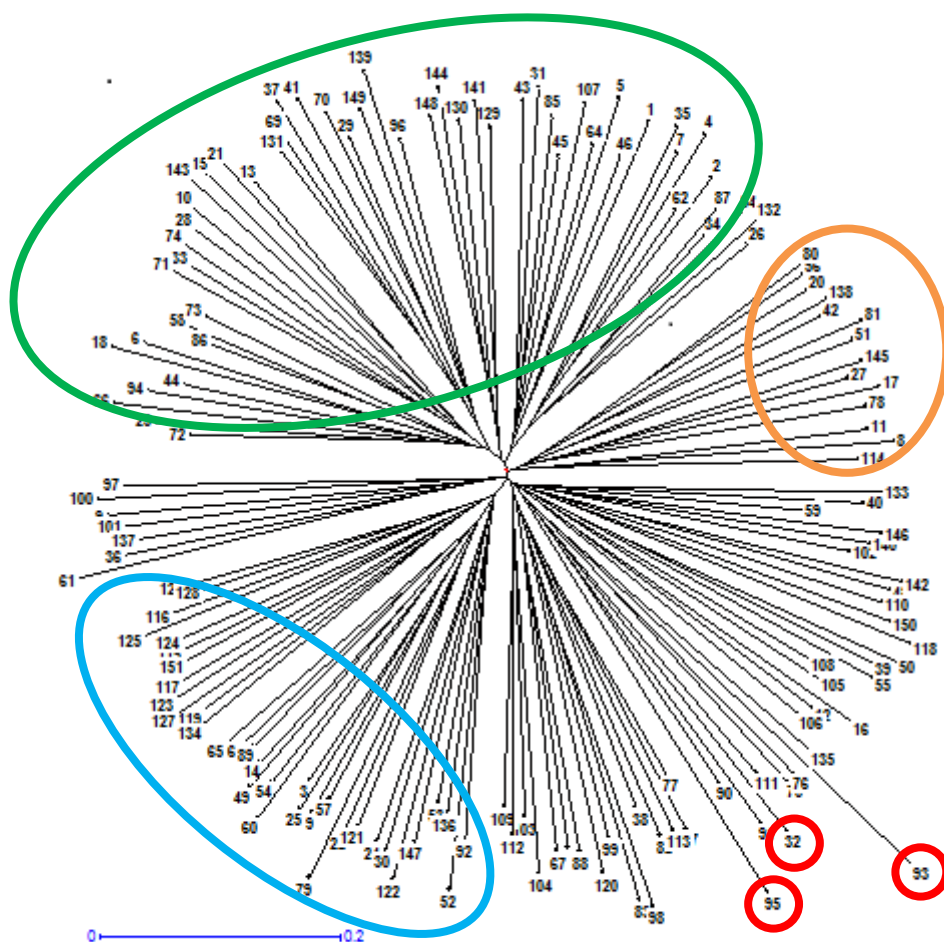


Figura 3.3 – Dendrograma de 151 genótipos (150 mangueiras da Embrapa e um porta enxerto usado por produtores na região sudeste) baseado na distância de Roger-W modificada e pelo agrupamento de Neighbor Joining. Em azul (híbridos e acessos norte americanos), verde (acessos brasileiros), em laranja acessos de diferentes origens e em vermelhos as três espécies diferentes de *Mangifera*

Os acessos Espada, Espada 35, Espada-rosa e Espada manteiga agruparam próximos e possivelmente, podem ser aparentados. O mesmo ocorreu com os acessos Rosa, Rosa2 Rosa36 e Rosa46, que também ficaram bastante próximos no agrupamento. Isso confirma o quanto esses acessos são similares entre si. E com essa similaridade podem não contribuir ou enriquecer o banco de germoplasma da Embrapa. Com uso de um maior número de locos microssatélites e/ou com outros tipos de marcador como SNPs (*Simple Nucleotide polymorphism*), e/ou dados agromorfológicos podem vir a confirmar a suposição de proximidade dos acessos e podem ser substituídos por outros acessos que venham a contribuir aumentando a variabilidade genética do banco e ser mais úteis no melhoramento da espécie.



No segundo grupo formado por cultivares floridianas (Simmonds, Scuper Many, Kent, Haden, Keitt, Frorigon, Haden-Rosa, Palmer, torbert, Momi-K, Zill, Winter e Van Dyker) os híbridos da Embrapa e os acessos de várias regiões do mundo (Amrapalli, Olour, Maya, Alphonso, Bhadauram, Heidi, Chené, Manilla, Manzanillo, Néldica, Apple DCG e Ataulfo) foram agrupados intercalando posições entre esses três tipos de acessos. E pode-se observar no dendrograma o quanto são similares. A maioria dos novos híbridos da Embrapa com iniciais CPAC formaram um grupo homogêneo, uma vez que dos 14 genótipos 10 ficaram bastante próximos, o que podem indicar terem o mesmo parental (Figura 3.3).

As espécies de *M. odorata*, *M. similis* e *M. foetida* tanto na simulação feita no estudo da estrutura genética feita pelo programa Structure como análise de distância genética realizada pelo método de Roger-W modificada baseado no agrupamento Neighbor Joining, agruparam juntas.

### 3.3.4 Análise de coordenadas principais

De modo análogo à análise de agrupamento Neighbor joining, a análise de Coordenadas principais baseada no complemento da distância de Rogers-W modificada, permitiu a formação de dois grandes grupos: um formado em sua maioria pelos acessos brasileiros e outro grupo formado pelos acessos norte americanos mais os acessos brasileiros que provavelmente são descendentes dos acessos norte americanos. Comparando com os resultados do agrupamento pode ser observado que os cultivares Tommy Atkins, Ducan, 65 e Eldon também ficaram fora do grupo pertencentes aos acessos norte-americanos demonstrando a consistência das análises. Outro fato que pode ter ocorrido é um erro de genotipagem dos locos de microssatélites ou pelo fato das características genéticas desses cultivares estarem mais próximas dos acessos brasileiros (Figura 3.4).

Hirano, Than, Watanabe (2010) também utilizaram coordenadas principais e analisaram acessos de origem indiana, norte americana, genótipos de origem desconhecida e também de Myanmar. Observou-se a formação de 3 grupos distintos com alguns acessos distribuídos entre os outros grupos. No presente estudo os acessos de diferentes origens ficaram distribuídos pelos dois grupos, o mesmo ocorreu no trabalho citado acima com os acessos nomeados como desconhecidos. Em outro trabalho, Viruel et al. (2005) com apenas 28 acessos, (11

tinham origem diferente e 17 origem norte americana) foi possível agrupar os acessos da Flórida em um grupo, no entanto, os outros acessos ficaram distribuídos formando mais três grupos pequenos.

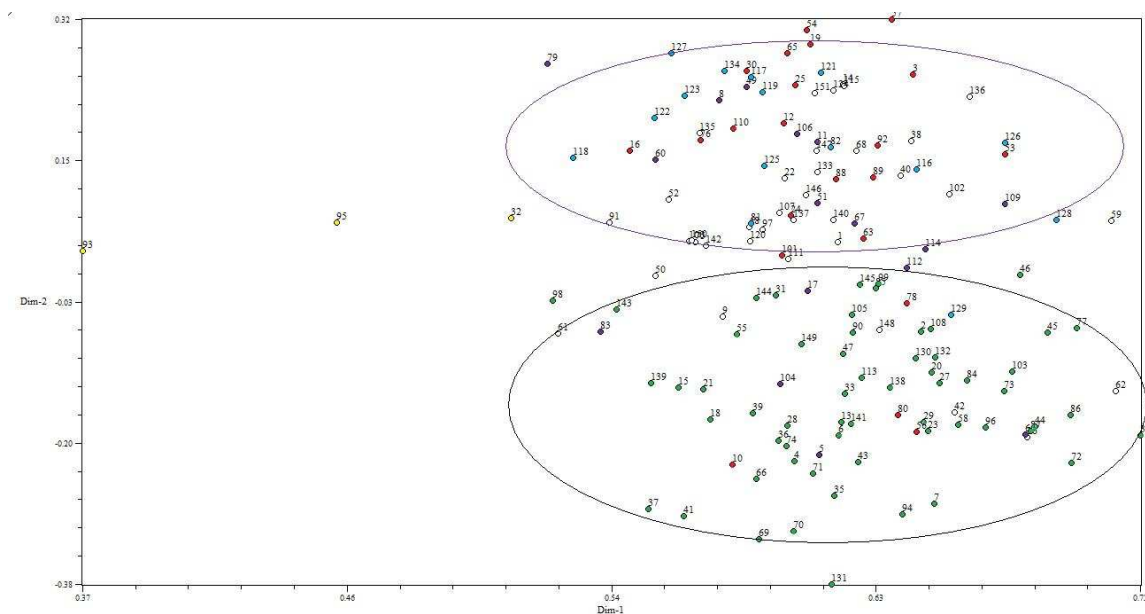


Figura 3.4 – Análise de coordenadas principais de 151 acessos de mangueira feita pela distância de Rogers-W modificada. Em amarelo (outras espécies de *Mangifera*), azul (híbridos), verde (acessos brasileiros) e em vermelho (cultivares norte americanas)

Schnell (2006) em seu estudo comparou os acessos de origem asiática com outras da Flórida em quatro combinações (Índia, Oeste da Índia e Sudeste da Ásia), (Índia e Flórida), (Oeste da Índia e Flórida) e (Sudeste da Ásia e Flórida), e em todas as análises foi possível separar em diferentes grupos, sendo que alguns acessos alocavam-se no grupo vizinho. Quando realizou-se as análises de coordenadas principais na população geral alguns acessos de mangueira da Flórida ficaram fora alocados em região em que outros grupos era mais frequentes. Os acessos asiáticos da (Índia, Oeste da Índia, sudeste da Ásia) quando comparados entre si foram agrupados em 3 grupos distintos.

### 3.3.5 Simulação de uma coleção nuclear

A simulação de uma coleção nuclear foi feita com base nos 20 marcadores moleculares, sendo que 30 (19,87%) dos 151 acessos de mangueira do

Banco de germoplasma da Embrapa Semiárido compõe a coleção nuclear de mangueira (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Trinta acessos de mangueira compõe a coleção nuclear do banco de germoplasma da Embrapa Semiárido obtida pela simulação do programa PowerCore a partir da coleção de 151 acessos

Nº	acesso	origem	Nº	Acesso	Origem
9	Manda D'agua	Brasil	66	Coração Magoado	Brasil
10	65	Florida	78	Tommy Atkins	Florida
12	Edward	Florida	81	Alfa	Brasil
16	Smith	Florida	82	Beta	Brasil
18	JuazeiroVII	Brasil	83	Malindi	África do Sul
19	Haden2H	Florida	93	M. similis	Tailândia
21	CPR	Brasil	95	M. foetida	Tailândia
24	Keitt	Florida	98	MonaMon DCG407	Brasil
31	Maçã	Brasil	100	Zill	Florida
48	Juazeiro IV	Brasil	116	CPAC07/66-86	Brasil
52	Néldica	África do Sul	118	CPAC10/4486	Brasil
54	Florigon	Florida	120	Itiúba	Brasil
59	BRS-Ômega	Brasil	122	CPAC16/94	Brasil
60	Alphonso	India	125	CPAC22/93	Brasil
61	Bhadauiam	India	135	Ouroporanga	Brasil

Comparando-se a riqueza alélica entre a coleção original e nuclear verifica-se que as duas coleções apresentaram o mesmo número de alelos (144 alelos) encontrado nos 20 locos de microssatélites, com média de 7,2 alelos por marcador que variou de 11 (Mind32) e dois para (Mind44).

Observando-se os índices de Shannon Weaver e de Nei, ambos revelaram permanecer a riqueza alélica na coleção nuclear. A correlação entre os índices de diversidade na coleção nuclear e na coleção inteira foram de 0,54 e 0,91 ( $p < 0,01$ ) para os índices de Shannon Weaver e de Nei, respectivamente. A distribuição dos índices de diversidade para os 20 locos de microssatélites para as duas coleções pode ser observada na Figura 3.5 A e B.

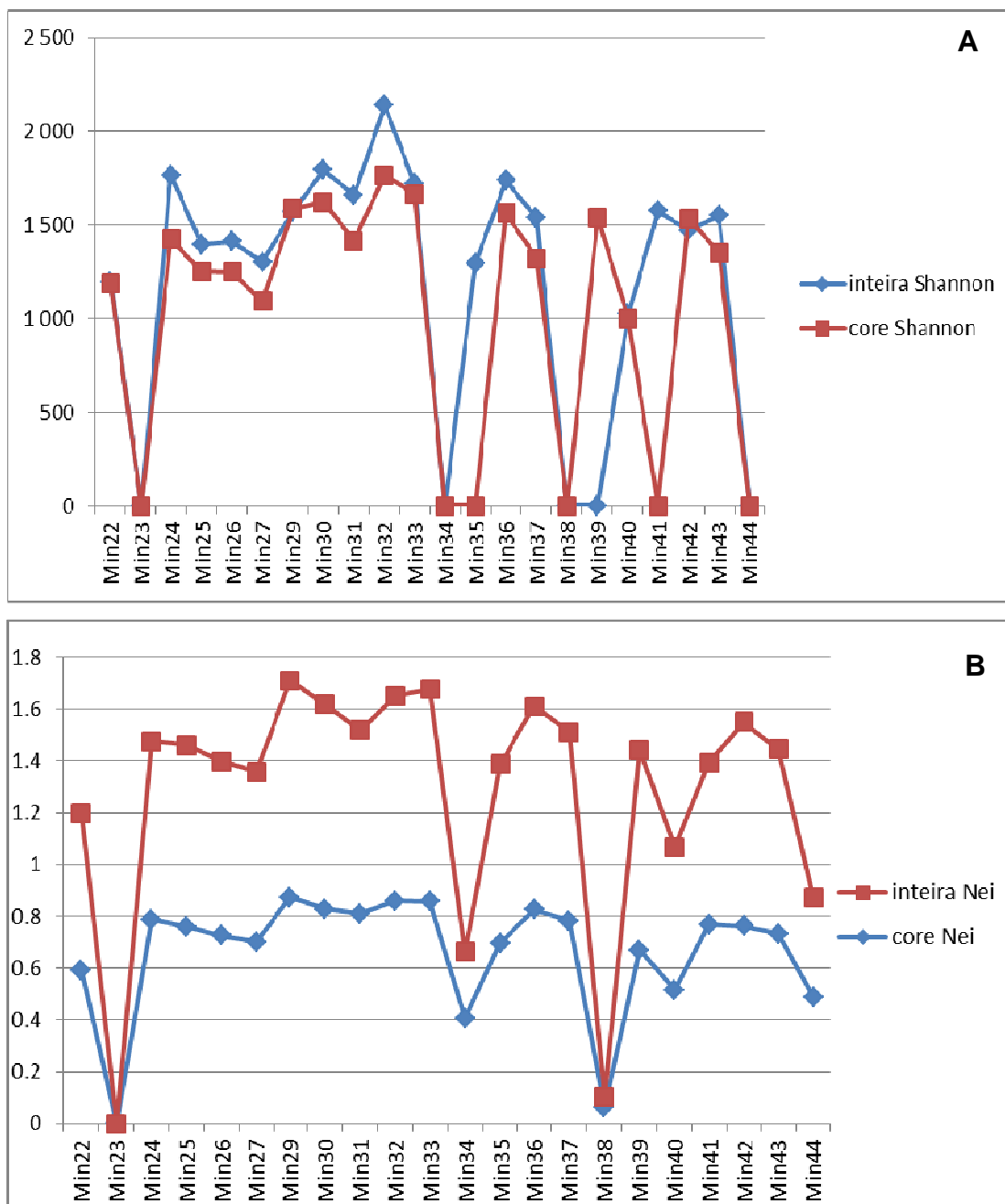


Figura 3.5 – Distribuição do índice de diversidade Shannon Weaver (A) e Nei (B) para 20 locos de microssatélites na coleção inteira e na coleção nuclear do banco de germoplasma de mangueira da Embrapa

Analisando o índice de diversidade de Nei foi possível observar 0,68 na coleção total, variando de 0,25 (Mind34) a 0,83 (Mind29). O índice de diversidade para a coleção nuclear médio foi de 0,72. Para o índice de Shannon Weaver médio foi observado 1,29, com variação de 0,52 (Mind44) a 1,766 (Mind32). A coleção nuclear apresentou média de 1,44, mínimo de 0,61 (Mind34) e máximo 2,14 (Mind32) (Tabela 3.5 A e B)

A coleção nuclear sugerida para manutenção de todos os alelos do BAG de mangueira da Embrapa foi obtida a partir de 151 acessos. A coleção foi estimada no programa PowerCore usando a estratégia M e a coleção foi composta por 30 acessos (Tabela 3.5). O número de acessos é equivalente a 19,86% do total de acessos de mangueira do BAG. Frankel (1984) comenta da importância do desenvolvimento de coleções nucleares como um meio para utilização de bancos de germoplasma de uma maneira mais efetiva e viável economicamente. No caso da manga em que o germoplasma permanece ex situ, pontencializar ou agregar características desejáveis em menos cultivares é interessante para objetivar a obtenção de cultivares mais produtivas e resistentes a várias doenças. E essa coleção nuclear alguns autores sugerem que tenha de 5-10% da coleção inteira e represente no mínimo 70% da diversidade genética da coleção original (BROW et al. 1987).

## Referencias

BALLY, I.S.E; LU, P.; JOHNSON, P.R. Mango Breeding. In: JAIN MOHAN, S.; PRIYADARSHAN, P.M. (Ed.). **Breeding Platation Tree Crops: Tropical Species**. New York: Springer, 2009. 653p.

DONADIO, L. C.; FERREIRA, F.R. Mangueira. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. p. 351-372.

DURVAL, M. F.; BUNEL, J.; SITBON, C.; RISTERUCCI, A. M. Development of microsatellite markers for mango (*Mangifera indica* L.) **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, p. 824-826, 2005.

EMBRAPA (2010) Fonte: **IBGE** - Produção Agrícola 2009. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Manga\\_Brasil\\_2009.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Manga_Brasil_2009.pdf)  
Acesso em: 12 Maio 2010.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, 2611-2620p., 2005.

FAO (2009) Disponível online: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>  
Acesso em: 12 maio 2010

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

FRANKEL, O. H. Genetic perspective of germplasm conservation. In: ARBER, W.; LLIMENSSE, K.; PEACOCK, W. J.; STRALINGER, P. (Ed.). **Genetic Manipulations: Impact on Man and Society**. Melbourne: Cambridge University Press, 1984. p. 161-170.

HIRANO, R.; OO, T.H.; WATANABE, K.N.; Myammar mango landraces reveal genetic uniqueness over common cultivars from Florida, India, and Southeast Asia. **Genome**, Ottawa, v.53, p.321-333, 2010.

KIM, K.W.; CHUNG, H.K.; CHO, G.T.; MA, K.H.; CHANDRABALAN, D.; GWAG, J.G.; KIM, T.S.; CHO, E.G.; PARK, Y.J. PowerCore: A program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets. **Bioinformatics**, Oxford, v.23, p. 2155-2162, 2007.

KNIGHT, R.J.; SCHNELL, R. J. Mango introduction in Florida and the 'Haden' cultivar's significance to the modern industry. **Economic Botany**. New York, v.48, p. 139-145, 1994.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data; version 1.0 (d16c). Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Acesso em: 10 ago. 2012.

LIU, J. **PowerMarker** V.30.(2006). [statgen.ncsu.edu/powermarker/](http://statgen.ncsu.edu/powermarker/)

LIU, K.; MUSE, S.V. PowerMarker: na integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v.21, p. 2128-2119, 2005.

PERRIER, X.; JACQUERMOUD-COLLET, J.P. DARwin software. 2006. Disponível em: <http://darwin.cirad.fr/darwin> Acesso em : 3 Março 2010.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N. A.; DONNELLY, P. Association mapping in strutucred population. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 67, n. 1, p. 170-181, 2000.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M A. Importância dos Recursos Genéticos Vegetais para o Agronegócio. In NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. Cap. 02. p. 61-119.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publisher, 2000. 98p.

ROSSETO, C.J.; RIBEIRO, I.J.A.; GALLO, P.B; SOARES, N.B.; SABINO, J.C.; MARTINS, A.L.M.; BORTOLETTO, N.; PAULO, E.N. Mango breeding for resistance to diseases and pests. **Acta Horticulturae**, Hague, v. 455, p. 299-304, 1996.

SCHNELL, R.J.; BROWN, J.S.; OLANO, C.T.; MEEROW, A.W.; CAMPBELL, R.J. KUHN, D.N. Mango Genetic Diversity Analysis and Pedigree Infences for Florida Cultivars Using Microsatellite Markers. **Journal of the America Society Horticultural Science**, Alexandria, v.131, n.2, p.214-224. 2006.

VIRUEL, M.A.; ESCRIBANO, P.; BARBIERI, M.; FERRI, M.; HORMAZA, J.I. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* L., anacardiaceae) with microsatellites. **Molecular Breeding**, Secaucus, v.15, p. 383-393, 2005.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**: variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. v.4, 580p.

## 4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AGROMORFOLÓGICA DE 103 ACESSOS DE MANGUEIRA

### Resumo

A cadeia produtiva da manga necessita que o melhoramento desenvolva cultivares agregando um conjunto de características desejadas pelo mercado consumidor, sendo os principais a produtividade, sabor agradável, Brix elevado e polpa sem a presença de colapso. O conhecimento da variabilidade genética faz-se necessário para delinear os objetivos que um programa de melhoramento deseja alcançar. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar 103 acessos de mangueiras que compõem o banco de germoplasma da EMBRAPA quanto à diversidade e estrutura genética usando caracteres fenotípicos e moleculares. Avaliando simultaneamente todos os caracteres com o método de otimização de Tocher, os acessos foram divididos em 23 grupos, e mais de 50% dos acessos ficaram distribuídos em 22 grupos sendo os demais 47 ficaram em um único grupo que também compreendeu cinco novas cultivares brasileiras. Também foi observado que as cultivares Haden e Tommy Atkins são bastante similares. Foi utilizado teste de atribuição a partir de características fenotípicas do tipo qualitativas e dados moleculares com resultados consistentes e foi possível dividir os acessos com base em suas características agrônômicas.

Palavras-chaves: Melhoramento genético; Manga; Diversidade genética; Marcadores moleculares

### Abstract

The mango breeding requires the development of new cultivars with important characteristics aimed by the purchasers, such as main productivity, good flavour, high brix, and internal fruit disorders. The knowledge of genetic variability is necessary to outline the goals that a breeding programme needs. The objective of this study was to characterize 103 mango trees accessions that make up the Embrapa germplasm regarding its diversity as well as genetic structure by means of molecular and phenotype traits. Evaluating simultaneously all the characters with Tocher method, 23 accessions groups were divided and more than 50% landraces were distributed into 22 groups; the other 47 accessions stayed in only one group that also included five new Brazilian cultivars. It was also observed that Haden and Tommy Atkins cultivars are quite similar. A clustering test was achieved using qualitative phenotype and molecular data with consistent results, and it was possible to form groups based on their agronomic characteristics.

Keywords: Genetic breeding; Mango; Genetic diversity; Molecular Markers



## 4.1 Introdução

A manga (*Mangifera indica* L.) é uma das principais frutas tropicais produzidas no Brasil. Pinto (1996); Pinto, Ferreira (1999) comentam que a mangicultura comercial brasileira ainda é baseada em algumas poucas cultivares de origem norte americana. E a cultivar mais produzida é a Tommy Atkins com 80% da área plantada, mesmo este cultivar apresentando alguns problemas como: malformação floral, colapso interno da polpa e sabor de baixa qualidade.

Pinto, Rossetto, Faleiro (2005) comentam a semelhança existente entre os bancos de germoplasmas internacionais. E as coleções brasileiras necessitam enriquecer a variabilidade genética por meio de prospecção de novos materiais genéticos nacionais e também introduzir acessos de outros países. Existe grande potencial ao uso dos recursos genéticos da manga, sendo que a maioria do germoplasma refere-se à espécie *Mangifera indica* (PINTO, FERREIRA, 1999).

O melhoramento convencional de frutas lenhosas e perenes, como a manga, necessita desenvolver variedades possuindo a maioria dos atributos desejados pela cadeia produtiva. O melhorista de manga tem a responsabilidade de aumentar o número de variedades que reúnam as melhores características agrônomicas e comerciais, reduzindo a vulnerabilidade existente nas grandes áreas de cultivos de manga no Brasil (Pinto, 2000; Krisha, Singh, 2007).

No desenvolvimento de novas cultivares é importante o conhecimento e caracterização satisfatória do germoplasma disponível a ser utilizado, sendo fundamental o conhecimento das fontes de variação, precisar o grau de riqueza do banco de germoplasma para o uso e conservação os recursos genéticos. E dar o suporte suficiente para o melhoramento aumentar a produtividade, e obter novas variedades com uso de coleções locais possivelmente mais adaptadas a região produtora (RAJWANA et al., 2011). Cruz, Caneiro (2006) comentam da importancia do conhecimento da diversidade genética para a identificação de genitores adequados para obtenção de híbridos mais heteróticos e, conseqüentemente, que proporcionam maior segregação em recombinações.

Para as cultivares de manga verifica-se que a variabilidade genética pode ser observada para caracteres fisiológicos, morfológicos e agrônomicos. Esta é importante em todo o processo no melhoramento genético, que por sua vez, depende da amplitude da base genética disponível, sendo influenciada pelo acervo

de recursos úteis disponíveis, na forma de materiais coletados e caracterizados, mantidos nos bancos de germoplasma (QUEIROZ; LOPEZ, 2007).

A caracterização varietal é um importante componente para o desenvolvimento e melhoramento na cultura da manga. E estabelece as bases para o progresso no desenvolvimento de novas cultivares. Desde a caracterização morfológica, bioquímica e molecular de variedades, linhagens ou híbridos do germoplasma de manga ainda não é frequentemente caracterizado e disponibilizado as informações.

As marcas de DNA tem se tornado uma ferramenta importante na proteção de plantas melhoradas nos países onde existem leis regulamentando o assunto. O “fingerprinting” com marcadores moleculares tem sido importante em processos que envolva disputas de direito autoral e tem sido considerado instrumental como suporte ao contínuo investimento em melhoramento de plantas por parte de grandes empresas produtoras de sementes híbridas (SINGH, 1989; RAJWANA et al., 2011).

O objetivo do presente trabalho foi extrair informações relevantes para o melhoramento genético de mangueira analisando em conjunto dados de marcadores moleculares e caracteres agromorfológicos. Foram testados diferentes métodos estatísticos populacionais para inferir a diversidade e estrutura genética dos acessos de mangueira da EMBRAPA.

## **4.2 Material e Métodos**

Para analisar o Banco de Germoplasma da EMBRAPA foram selecionados 103 acessos de mangueira pela maturidade produtiva (Tabela 4.1). Estes acessos foram avaliados por meio de dados agromorfológicos e de marcadores moleculares.

### **4.2.1 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo CTAB. Colocou-se em microtubos de 2,5ml 400mg de folha de mangueira triturada. Em tubo, 800µL de tampão de extração pré-aquecido à 65°C (CTAB 3%, 2M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH8,0, PVP-40 2% e β-mercaptoetanol 0,6% no momento da

extração). O material foliar junto com o tampão foi homogeneizado e colocados em banho-maria a 65°C por 50 min. Decorrido o tempo foi adicionado 600µL de CIA (CIA, 24:1 clorofórmio:álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. A precipitação do DNA foi realizada com 600µL de isopropanol gelado, com incubação a -20°C por 1h. E posteriormente, foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado, em duas etapas consecutivas, com etanol 70% e uma vez com etanol absoluto com centrifugação a 12.000 rpm por 3 min. O precipitado foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 100µL de TE (10mM Tris HCL pH 8,0 e 1mM EDTA, pH8,0). Para concluir a extração, cada amostra de DNA foi tratada com 1µL de RNase (10mg mL<sup>-1</sup>, Ribonuclease A, Sigma a temperatura ambiente overnight e armazenados à -20°C identificados.

A qualidade do DNA (concentração e pureza) foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0%, TBE 1X (89mM Tris, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA), a 100 V, corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado sob UV (Major Science Compact Digimage System). Para avaliar a quantidade de DNA extraído de todas as amostras foi usado DNA do fago λ, com concentrações variando entre 50 e 250ng.

Tabela 4.1 – Relação dos 103 acessos utilizados no estudo da variabilidade genética de mangueira (*Mangifera indica*)

Acessos			Acessos			Acessos		
1	Amrapali (IND)	36	Irwin (EUA)	71	Amarelinha (BR)			
2	Mallika (IND)	37	Tommy Atkins (EUA)	72	Caxangá (BR)			
3	Scuper Many (EUA)	38	Papo de Peru I (BR)	73	Itamaracá (BR)			
4	Surpresa (BR)	39	China (BR)	74	Imperial I (BR)			
5	Kensington (AUS)	40	Favo de mel (BR)	75	Kent (EUA)			
6	Rosary (BR)	41	Morais (BR)	76	Extrema (BR)			
7	Edward (EUA)	42	M-13269 (EUA)	77	Bourbon (BR)			
8	Hilda (BR)	43	Coração magoado (BR)	78	Langra (IND)			
9	Ipuçaba (BR)	44	Juazeiro IV (BR)	79	Van Dyke (EUA)			
10	Manga d'água (BR)	45	Espada (BR)	80	Brasil (BR)			
11	Simmonds (EUA)	46	Ruby (EUA)	81	Espada Manteiga (BR)			
12	Pingo de Ouro (BR)	47	Espada Ouro (BR)	82	Olour (IND)			
13	Salitre (BR)	48	Espada 35 (BR)	83	Duncan (EUA)			
14	Juazeiro II (BR)	49	Ametista (BR)	84	Calmon (BR)			
15	Mastruz (BR)	50	Pingode Ouro DPV(BR)	85	Apple DCG (TAI)			
16	Juazeiro III (BR)	51	Umbu (BR)	86	Roxa (BR)			
17	Keitt (EUA)	52	Rosa (BR)	87	Alfa (BR)			
18	Foice (BR)	53	Black Java (AUS)	88	Palmer (EUA)			
19	Juazeiro VI (BR)	54	Dama de Ouro (BR)	89	Torbet (EUA)			
20	Recife (BR)	55	Carabão (FIL)	90	Parwin (EUA)			
21	Smith (EUA)	56	Manguito (BR)	91	Itiúba (BR)			
22	Haden 2H (BR)	57	Bonita (BR)	92	Heidi (RSA)			
23	Nego não chupa (BR)	58	Sta Alexandrina (BR)	93	Chené (RSA)			
24	Espada Itaparica (BR)	59	Manilla (FIL)	94	Joa (RSA)			
25	Manzanillo (MEX)	60	Maçã (BR)	95	Mallindi (IND)			
26	CPR (BR)	61	Comprida Roxa (BR)	96	Néldica (RSA)			
27	Pêssego DPV (BR)	62	Eldon (EUA)	97	Espada Vermelha (BR)			
28	Tyler Premier (EUA)	63	Da porta (BR)	98	BRS Ômega (BR)			
29	Haden (EUA)	64	Carlotão (BR)	99	R2E2 (AUS)			
30	Mon Amon (TAI)	65	Florigon (EUA)	100	Beta (BR)			
31	Pricesa (BR)	66	Maya (MEX)	101	Haden Rosa (BR)			
32	65 (EUA)	67	Momi-K (EUA)	102	Ataulfo (MEX)			
33	Ubá (BR)	68	PrimordeAmoreira(BR)	103	Lita (BR)			
34	Zill (EUA)	69	Dashehari (IND)					
35	Winter (EUA)	70	Alphonso (IND)					

Sinônimos das siglas: (BR) Brasil, (EUA) Estados Unidos da América, (IND) Índia, (MEX) México, (FIL) Filipinas, (RAS) República da África do Sul, (TAI) Tailândia

#### 4.2.2 Amplificação dos locos de microssatélites e genotipagem

Os 20 locos microssatélites foram selecionados pelo polimorfismo apresentado e o PIC (*Polymorphism information content*) (Tabela 4.2). Os locos de microssatélites utilizados neste estudo foram os desenvolvidos no capítulo 2.

Tabela 4.2 - Iniciadores de microssatélites para manga (*Mangifera indica*)

Loco	Forward	Reverse	PIC
Min22	GCATGTTTAATAATATATAGATAA	CTGGGAAGAACAAAGGAT	0,44
Min24	ACTAAGAGCAAAGTGTGTGTGT	CATGACTCTATCTGGGCAGT	0,61
Min25	CGCCGATTCAAACCTCAAG	TAACAACCGCAACGCTTTA	0,72
Min26	AAACAGGTGGGTGTGATCC	GCGTTGGTCCCTTCAAGT	0,67
Min27	ACCTAGCCTGAGAAATCC	ACAAGGAGGGGAATATGA	0,64
Min29	GCCTAACTCTTCGGAAATGG	CTGTCTGTGTGTGGTTGAATGA	0,64
Min30	GCAATTTGGGTGTTGGAT	GCGAGAGTGTCTATGCGAG	0,73
Min31	AAGAGCCAGAACAGGGAC	GCCTTCCAATTTTATGC	0,77
Min32	CCTGATACACAATAAAAAATAGTAATA	TGACCCTTTGCCTAGCTT	0,77
Min33	AAGAGCCAGAACAGGGAC	GCCTTCCAATTTTATGC	0,78
Min34	GAAGTTTTCTGTGGCAG	AAATAAGGTACGGCGAAT	0,16
Min35	CGCCGATTCAAACCTCAAG	GCCACTCCGCAAACCTAAA	0,74
Min36	TGGTTTGGTGGGGACATT	GGTGCTTAAAAGATGTTGGTG	0,79
Min37	CTCTTCCTAAGTCCCCAA	GTGCCTGTCATTGTTGAA	0,68
Min39	ACGGAGAAACAGAGCCA	TCAAGTGAAGCTGAGCAC	0,70
Min40	TCTTTCACAGATTTTCTCTGC	TGTGGCAATATGGGATGTC	0,68
Min41	CTCATCTTCTGCGACCAA	GTACGTGTTTCTGACTTTCC	0,76
Min42	TTCCCGCTCACCAATTAT	TGGACGATGCTCTTTTCTC	0,74
Min43	AGCAATCAAGCATCAAGAAT	TCCCACAGTACAAGCACAGA	0,68
Min44	TGATGGAGAAGTAAATGGATGC	TTGAGTGGAGGTTGAAAAGC	0,28

Todos os iniciadores foram testados com a mesma concentração de DNA. Os reagentes para PCR foram: tampão 1X (Fermentas Life Science); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas Life Science); 0,3 mM de dNTP (Fermentas Life Science); 0,2 µM de iniciadores *forward* e *reverse*; 1 U Taq polimerase caseira ou Fermentas Life Science e 10ng de DNA; volume final de 20 µL. As reações de otimização foram realizadas em termociclador BIO-RAD MyClycler, e o programa utilizado para os testes de amplificação dos iniciadores foi específico com desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 33 ciclos a 94°C por 1 min, temperatura de anelamento variando de 65°C até 45°C por 1min (temperatura de anelamento específica para cada reação de teste) e 72°C por 1min; e extensão final a 72°C por 10min.

As amplificações das reações foram visualizadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, TBE 1X (100V), corado com SYBR Safe, o tamanho do alelos foi estimado comparado a partir de marcador de peso molecular

de 100 bp (Fermentas Life Science). Os produtos das reações foram selecionados quando visualizado uma única banda, com tamanho de alelo aproximado ao desenho prévio do par de iniciadores. Após foi testado em gel de poliacrilamida 7% com o intuito de observar a existência de polimorfismo nos novos locos, conforme descrito no item 2.2.8.

#### **4.2.3 Caracteres avaliados em campo**

Os 103 acessos de mangueira foram avaliados para 48 características fenotípicas em campo sendo os dados cedidos pela Embrapa Semiárido. As coletas dos dados foram realizadas no campo experimental da unidade da Embrapa localizada na cidade de Juazeiro, no Estado da Bahia. Utilizaram-se 48 descritores (BRASIL, 2002), sendo que para cada genótipo havia quatro repetições. E para cada acesso foram amostradas oito folhas adultas, oito inflorescências e 16 frutos por planta. Foram utilizadas somente as médias de todos os dados avaliados.

Os caracteres avaliados foram os seguintes:

Árvore:

Hábito de crescimento (Vertical, semi-vertical a vertical, semi-vertical, semi-vertical a aberto e aberto).

Folhas juvenil:

Coloração pela antocianina (ausente ou presente).

Folha desenvolvida:

Comprimento do pecíolo (curto, médio, longo); Posição em relação ao ramo (semi-ereta, horizontal, semi-pendente); Simetria (ausente ou presente); Comprimento (curto, médio, longo); Largura (estreita, média, larga); Razão comprimento/largura (curto, muito baixa, baixa, média, alta, muito alta); Forma predominante (lanceolada a ovada, lanceolada, elíptica lanceolada); Ondulação da borda do limbo (fraca, média, forte); Forma da base (aguda, obtusa, arredondada); Forma do ápice (acuminada, cuspidada, aguda).

Inflorescência:

Comprimento (curto, médio, longo); Largura na base (estreita, média, larga); Forma (cônica, cônica a piramidal, piramidal, piramidal larga).

#### Fruto (ponto de colheita):

Comprimento (muito curto, curto, médio, longo, muito longo); Largura seção transversal (muito estreita, estreita, média, larga, muito larga); Razão comprimento/largura (muito baixa, baixa, média, alta, muito alta); Forma seção transversal (elíptico estreita, elíptico larga, circular); Cor da epiderme (verde, verde e amarela, verde e rósea, verde e laranja, verde e vermelha, verde e roxa); Cerosidade (presente, ausente); Profundidade da cavidade penducular (ausente ou muito baixa, baixa, média, alta, muito alta); Proeminência na base do pedicelo – pescoço (ausente, presente); Base do pedicelo – pescoço (ausente, muito fracamente notada, fracamente notada, fortemente notada); Forma da base ventral (arredondada para cima, arredondada plana, arredondada para baixo, Inclinação para abaixo, Inclinação abrupta); Forma da base dorsal (arredondada para cima, arredondada plana, arredondada para abaixo, Inclinação para baixo, inclinação abrupta); Reentrância – sinus (ausente, presente); Profundidade da reentrância – sinus (muito fracamente notada, fracamente notada, fortemente notada, ausente); Protuberância próxima à cicatriz pistilar – bico (presente, ausente); Forma da cicatriz pistilar – bico (reentrante, no plano, saliente); Quantidade de látex no pedúnculo (ausente ou muito baixa, média, alta).

#### Fruto ponto de consumo:

Cor predominante da epiderme (verde, verde amarelada, amarela e verde, amarela, amarela e laranja, laranja, rósea, amarela e vermelha, laranja e vermelha, vermelha, laranja e roxa, vermelha e roxa, roxa); Distribuição da coloração da casca (uniforme, desuniforme); Densidade das lenticelas (baixa, média, alta); Tamanho das lenticelas (pequena, média, grande); Espessura da casca; peso da casca; Aderência da casca à polpa (fraca, média, forte); cor principal da polpa (amarela esverdeada, amarela pálido, amarela, laranja pálido, laranja, laranja escura); Suculência (baixa, média, alta); Peso da polpa; Fibrosidade da polpa (não fibrosa, pouco fibrosa, muito fibrosa); Quantidade de fibra aderida ao caroço (muito baixa, baixa, média, alta, muito alta); Quantidade de fibra ligada à polpa abaixo da casca (baixa, média, alta); Firmeza da polpa; sólidos solúveis (baixo, médio, alto).

#### Caroço:

Relevo da superfície do endocarpo (Lisa, com fendas, enrugada), Peso, Forma (oblonga, levemente reniforme, reniforme); Embrionia (monoembriônica,

predominantemente monoembriônica, predominantemente poliembriônica, poliembrionica).

Os dados de campo foram usados em conjunto com os dados moleculares para estimar os parâmetros genéticos.

#### 4.2.4 Análise dos dados

##### 4.2.4.1 Análise de agrupamento

As análises estatísticas multivariadas foram usadas para quantificar a divergência genética dos acessos de mangueira, para tal utilizou-se o complemento do coeficiente aritmético de Jaccard para variáveis categóricas, a distância Euclidiana média para as variáveis contínuas e distância de Roger-W modificada para os dados moleculares. A divergência genética foi observada usando o método de agrupamento do algoritmo de otimização de Tocher.

##### 4.2.4.2 Matrizes de distância

A matriz de distância para as variáveis categóricas foi obtida pela transformação da média de cada variável e convertidos em dados binários tipo 1 e 0, classificados pela presença e ausência de cada categoria no acesso. Em seguida foi calculado o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard dados por:

Em que

$$d_{ij}' = 1 - s_{ij}'$$

Em que

$$s_{ij}' = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que

a: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 1-1 para cada par de acessos;

b: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 1-0 para cada par de acessos;

c: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 0-1 para cada par de acessos;



Para obter a matriz de dispersão para as variáveis contínuas foi utilizado as médias disponibilizadas pela EMBRAPA e calculado a distância Euclidiana. A distância Euclidiana foi estimada a partir das variáveis transformadas utilizando-se a seguinte expressão:

$$d_{ii'} = \sqrt{\sum_j (Y_{ij} - Y_{i'j})^2}$$

A distância de Roger-W modificada foi usada para obter a matriz de distância pelos pares de genótipos dos dados moleculares. Estimada por:

$$MRD = \frac{1}{\sqrt{2M}} \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m (p_{ijx} - p_{ijy})^2}$$

Em que

m = número de locos avaliados;

$p_{ijx}$  = frequência do alelo j, no loco i, no indivíduo x;

$p_{ijy}$  = frequência do alelo j, no loco i, no indivíduo y.

As matrizes de distância foram obtidas entre os pares de genótipos. Foram construídas três matrizes de dissimilaridade para o conjunto de dados, uma matriz para variáveis categóricas, uma matriz para as variáveis contínuas e uma matriz para os dados moleculares. Com todas as matrizes foi contruída uma única matriz para analisar a divergência entre os acessos de mangueira.

Após a soma de todas as matrizes foi definido os agrupamentos utilizando o algoritmo de otimização de Tocher. Com a mesma matriz foi obtido o dendrograma com base na similaridade genética dos genótipos. Realizou-se a construção do dendrograma pelo método de agrupamento Neighbor Joining. O dendrograma foi obtido pelo software DARwin, em que foram testados a estabilidade dos agrupamentos por meio de 10.000 reamostragens bootstrap (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006).

#### **4.2.4.3 Estrutura populacional**

O programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) foi utilizado para realizar a análise de estrutura populacional entre os acessos. Os parâmetros utilizados foram burn-in de 300.000 seguido por 500.000 iterações, no modelo no admixture com frequências alélicas independentes. Os valores de K de 1 a 10 foram testados, com 20 iterações independentes para cada agrupamento. A determinação do número K mais provável em relação aos propostos foi realizado utilizando o método de Evanno, Regnaut e Goudet (2005). Nesta etapa foram utilizados os dados genéticos de duas maneiras diferentes, os dados moleculares (20 SSRs) e posteriormente os moleculares e fenotípicos em conjunto (20 SSRs mais 36 dados qualitativos). Os dados em conjunto foram transformados em dados binários e multicategóricos com a finalidade de utilizar todas as informações obtidas do banco de germoplasma.

### **4.3 Resultados e Discussão**

#### **4.3.1 Análise de agrupamento**

##### **4.3.1.1 Variáveis categóricas, contínuas e moleculares**

Os resultados foram gerados pelas matrizes de distância Euclidiana geradas pelas variáveis contínuas, a matriz do coeficiente de Jaccard obtida pela análise das variáveis categóricas e a matriz obtida por Roger-W foram padronizadas e somadas. Com a soma das matrizes foi obtida uma matriz única resumindo as informações de distâncias detectadas entre os acessos. Com as variáveis foram reunidas simultaneamente em categóricas, contínuas e moleculares, os acessos formaram 23 grupos (Tabela 4.3). Dos 103 acessos de mangueiras, 47 (45,63% dos acessos) formaram o primeiro grupo, dentre estas agruparam as cultivares Ubá, Keitt, mais 11 cultivares norte americanas.

Outros 46 acessos formaram 12 grupos e os 10 acessos mais contrastantes em relação aos outros acessos formaram cada um seu próprio grupo. Dentre estes dez grupos de acesso único, três acessos eram da Florida (Kent, Palmer e Scuper Many), quatro grupos formados por acessos do Brasil (Juazeiro VI,

Ametista, Rosary e Comprida roxa) e mais dois acessos (Chené e Ataulfo) de origem Sul africana e Mexicana respectivamente. As cultivares Kent e Palmer são cultivares que agregam mais qualidades desejadas pelo mercado consumidor. A Palmer é a cultivar que agrada o consumidor diretamente pela qualidade do fruto e sabor agradável em comparação com as outras cultivares.

Um grupo formado por dois acessos reuniu as cultivares Haden e Tommy Atkins. A equipe do Schnell et al. (2006) estudou a origem dos cultivares americanas com marcadores moleculares e confirmaram que a Haden foi genitor de muitos cultivares. E esta cultivar foi usado com frequência por suas características agronômicas favoráveis. O que pode ser ressaltado é que Tommy Atkins é progênie da Haden e foi a única cultivar que ficou no mesmo grupo. Dentre as cultivares originadas pela Haden, possivelmente, a Tommy Atkins é a cultivar que apresenta um conjunto gênico mais parecido com seu genitor, a Cultivar Haden. Isso pode explicar o motivo da cultivar Tommy Atkins ser uma fruta tão aceita no mercado consumidor pelas suas características de prateleira, mesmo esse cultivar não tendo um sabor agradável e o Brix (quantidade de açúcares) ser considerado baixo. Outro grupo foi formado por dois cultivares (Florigon e Edward), que são descendentes diretos da Haden.

Os cultivares da Florida foram alocados em vários grupos e sugere existência de expressiva variabilidade genética e provável fixação de novos alelos pela recombinação, segregação e seleção dos melhores genes realizados pela polinização aberta. A polinização aberta em mangueira monoembriônicas corrobora com o aumento da variabilidade genética da espécie. Schnell (2006) relata em seu trabalho que os cultivares Zill, Palmer, Van Dyke, Edward, Florigon também são progênies da cultivar Haden. As análises com as características moleculares, contínuas e categóricas em conjunto viabilizou observar a variabilidade existente nessas progênies e estes seis cultivares foram alocados em 3 grupos diferentes e a Palmer foi a mais contrastante entre os cultivares ficando num grupo único.

Os acessos brasileiros podem ser visualizados na tabela 4.3 e a maioria dos cultivares foram alocados no primeiro grupo sugerindo alto grau de similaridade entre os acessos. Observando os cultivares/híbridos da Embrapa mais recentes que compõe a população estudada (33-Ubá, 86-Roxa, 87-Alfa, 97-Espada vermelha, 98-BRS Ômega, 100-Beta) pode ser observado que ainda há a necessidade de realizar novos cruzamentos e selecionar cultivares com o perfil que

agrade mais o mercado consumidor. Visto que, dos seis cultivares, cinco ficaram localizados no grupo um. A cultivar Ubá, importante na produção de sucos ficou agrupada no mesmo grupo. Os acessos mais cultivados pelos pequenos produtores e plantados em pequenas propriedades como os acessos Espada(s), Rosa, Coração magoado, Carlotão sem elevado valor comercial e qualidade de produção apresenta considerável variabilidade genética.

Segundo Cruz, Carneiro (2006) as técnicas multivariadas permitem realizar o agrupamento dos acessos. E é importante para a manutenção do germoplasma, gerir sua utilização e determinar o potencial dos acessos divergentes que podem gerar populações com maior variabilidade genética. A análise de agrupamento permitiu identificar grupos de acessos similares e acessos contrastantes presentes no banco de germoplasma.

Tabela 4.3 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando simultaneamente 12 variáveis contínuas, 36 categóricas e 20 moleculares em 103 acessos de mangueira do banco de germoplasma da EMBRAPA

Grupos	Indivíduos
1	13; 27; 05; 26; 12; 31; 17; 30; 72; 80; 44; 85; 14; 10; 36; 100; 50; 46; 81; 4; 39; 11; 96; 84; 87; 69; 18; 56; 33; 24; 98; 73; 79; 22; 34; 54; 32; 16; 35; 86; 103; 92; 90; 89; 83; 51; 20;
2	68; 74; 42; 41; 40; 28; 95; 62; 60; 101; 57; 63; 55;
3	47; 97; 43; 23; 02; 58; 08; 59;
4	64; 71; 94; 21;
5	25; 99; 67;
6	38; 91; 70;
7	45; 48;
8	76; 78; 53;
9	15; 52;
10	01; 82;
11	66; 77;
12	29; 37;
13	07; 65;
14	93;
15	75;
16	61;
17	102;
18	88;
19	09;
20	03;
21	06;
22	49;
23	19;

Os programas de melhoramento necessitam e são diretamente dependentes da variabilidade genética e de médias altas para os caracteres de interesse. E o mais relevante é ampliar a base genética nas variedades melhoradas

é trazer informações por meio da caracterização de variedades tradicionais analisando o fenótipo e como consequência o maior entendimento das características de interesse aos melhoristas e como consequência, o êxito do melhoramento da espécie em questão. Em regiões de cultivo de manga, as tentativas de obtenção de novas cultivares melhoradas estão em andamento. E informações precisas sobre as relações genéticas dentro da diversidade do germoplasma é muito importante para uso no melhoramento genético (BALLY, GRAHAM, HENRY, 1996; PANDIT, et al. 2007).

O Banco de germoplasma da EMBRAPA (*Mangifera indica*) pode ser considerado pequeno comparado com bancos de germoplasma Indiano, Americano e de Myanmar. No entanto, o BAG apresenta acessos de todas as regiões importantes produtoras de manga. Sendo ainda necessário em um futuro próximo a prospecção de mais genótipos para enriquecer o BAG para uso no melhoramento para obtenção de cultivares mais adaptadas e com caracteres requeridos pelo consumidor.

Os resultados obtidos pelo agrupamento de otimização de Tocher teve grande relevância para identificação de cultivares que em um futuro próximo podem ser identificados pelo conjunto de características apresentadas nos dados agromorfológicos e moleculares. Dos 23 grupos formados, 10 grupos foram formados por acessos únicos, seis grupos apresentam dois acessos cada e três grupos com três acessos cada. De forma mais minuciosa, individualmente, os acessos ou cultivares podem ser analisados pelo conjunto de dados observados e quais características molecular e morfológica pode separar cada acesso. Para uma melhor identificação dos acessos é necessário a implementação do maior número de marcas morfológicas e/ou moleculares.

Para o grupo um, em que houve maior número de indivíduos no mesmo grupo, 47 no total, é interessante que haja a preocupação de uma melhor identificação dos cultivares e principalmente, os acessos que apresentem um maior e melhor pool gênico para geração de novas progênies recombinantes com maior número de características favoráveis.



O agrupamento foi formado pela junção dos 20 marcadores de microssatélites e 48 características fenotípicas sendo 12 características contínuas e 36 categóricas. Com a junção destes dados dos 103 acessos do banco de germoplasma de mangueira da Embrapa disponíveis foi separado em dois grupos. Os acessos eram constituídos de 59 acessos brasileiros, 23 norte americanos e 21 de várias localidades do mundo (África do Sul, Austrália, Índia, Filipinas, Tailândia e México). Para todos os acessos houve a formação de dois grupos.

Dentre os acessos brasileiros, as variedades brasileiras Rosa, Espada, Espada 35, Espada Itaparica, Espada Ouro ficaram agrupadas próximas. Resultado aproximado pode ser observado no trabalho de Santos et al. (2008) utilizando apenas marcadores do tipo AFLP no mesmo banco de germoplasma composto de 107 acessos, sendo que os mesmos acessos crioulos ficaram agrupados juntos. Isso demonstra que os acessos são bastante similares.

Os 103 acessos não formaram grupos por região de origem ou não foi possível analisar com precisão por características agronômicas relevantes na cadeia produtiva da fruta. Uma característica muito utilizada para seleção de cultivares, segundo Folegatti et al. (2002), foi o rendimento da polpa que é requerido para agroindústria no processamento de polpa para sucos, néctares e outros tipos de processados. Apenas é aceito cultivares cujos frutos tenham rendimento de polpa superior a 60%. Outra característica é o tamanho do fruto de mesa para o mercado europeu que fica em torno de 300 a 450g e para o mercado norte americano que exige frutos entre 250 a 600g (PIZZOL et al., 1998; Comunidad andina, 2005).

Pode ser observado no agrupamento e comparado com as médias de peso de polpa (dados presente na tese de Santos, 2010 e não amostrados) que os acessos com maior produção de polpa em sua maioria (75-Kent 569,83g; 7-Edward 538,1g; 25-Manzanillo 544,9g; 99-R2E2 783,14g e Papo de Peru I 485,86g) ficaram no mesmo grupo (Figura 4.1). No outro grupo pode ser comparado ao peso e os acessos que ficaram próximos apresentam menor peso médio de polpa (22-Haden2H 133,3g; 46-Ruby 176,58g; 15-Juazeiro II 106,0g; 52-Rosa 103,26g; 56-Manguito 78,14; 45-Espada35 113,51; 24-Espada Itaparica 113,4g; 65-Florigon 132,21g) (Figura 4.1). Estes resultados necessitam de outros experimentos para serem testados e saber qual relação os marcadores moleculares e os dados fenotípicos podem ser úteis para realizar seleção de cultivares com caracteres requeridos pelo mercado. Mesmo assim, no grupo inferior do dendrograma pode ser

observado que a maioria dos acessos apresentava peso de polpa de 250 gramas abaixo, com algumas exceções. Neste grupo com 53 acessos apenas 9 apresentavam peso superior a 260 gramas. O contrario ocorreu no grupo superior em que a maioria dos genótipos apresentava peso superior a 250gramas. Pode-se lembrar de que a produção de polpa é uma característica quantitativa e de difícil seleção porque estão envolvidos vários genes na expressão do caráter.

Santos, Lima Filho, Lima Neto (2010); Santos, Lima Neto (2011) identificaram em seus estudos locos de microssatélites capazes de identificar a origem de mudas Haden e Tommy Atkins. Estes mesmos autores comentam da importância de realizar cruzamentos para agregar maior número de caracteres que possibilite melhorar a qualidade de cultivares que já apresentam elevado número de caracteres favoráveis. Isso porque o melhoramento de manga por meio da reprodução tem sido tradicionalmente lenta e difícil, com programas de melhoramento muitas vezes levando mais de 20 anos para obtenção de um novo cultivar. Há um certo número de características que contribuem para a lentidão no desenvolvimento de novas cultivares e o pequeno tamanho dos programas de melhoramento convencional para a manga (BALLY, LU, JOHNSON, 2009).

Outros pontos importantes na base do melhoramento é realizar estudos para documentar cultivares, gerenciar apropriadamente os bancos de germoplasma de mangueira, e para conservar é indispensável preencher lacunas na coleção e assim, manter os recursos genéticos únicos e valiosos, tanto nacionais como de perspectiva global (HIRANO, HTUN OO, WATANABE, 2010).

#### **4.3.1.3 Análise da estrutura populacional**

A análise da estrutura da população foi realizada utilizando teste de atribuição disponível no programa STRUCTURE para os 103 acessos de mangueira, Primeiramente, foi feita a atribuição com apenas os dados moleculares para ser usado como parâmetro e controle na análise utilizando o conjunto de dados composto por marcadores moleculares e morfológicos. Em seguida foi feita a simulação usando os dados moleculares e morfológicos qualitativos. Os dados foram usados em conjunto e transformados em dados binários e categóricos.

Os valores sugeridos de K segundo Pritchard, Stephens e Donnelly (2000) e de  $\Delta K$  de Evanno, Regnaut e Goudet (2005) apresentaram picos K=2



semelhantes para os dois conjuntos de dados tanto para gráfico em que foi utilizado apenas dados moleculares e o formado pelo conjunto de dados moleculares e morfológicos (Figura 4.2). Analisando a estrutura populacional formada pelos dois conjuntos de dados foi possível observar a consistência dos resultados e da formação dos subgrupos. Nos dois dendrogramas houve a formação de duas subpopulações. E estas subpopulações formadas foram constituídas pelos mesmos acessos nas duas populações. Em alguns casos apenas havia a mudança de ordem dos acessos nos grupos. A exceção foi os acessos (44 juazeiro IV, 73 Itamaracá e o 102 Ataulfo) que mudaram de grupo nas análises feitas por meio dos dados moleculares e morfológicos, simultaneamente.

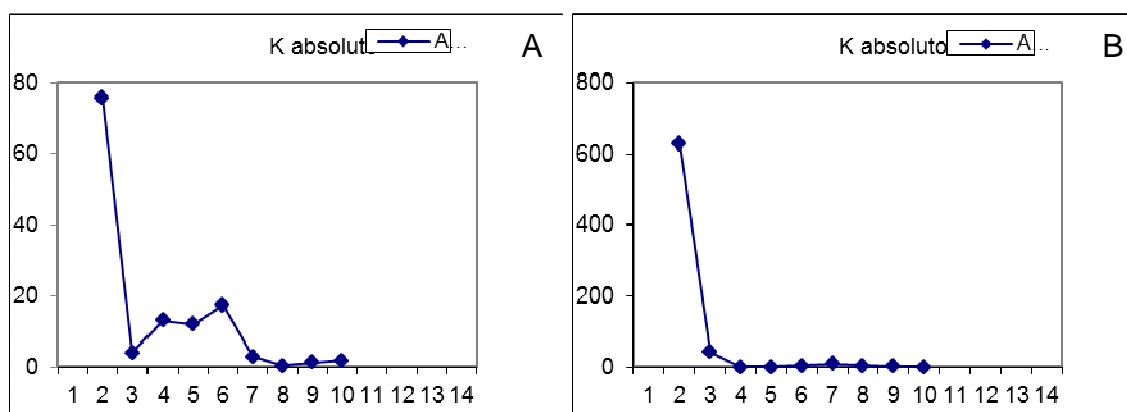


Figura 4.2 –  $\Delta K$  de Evanno et al (2005) para 20 repetições de simulações no programa Structure K = 1 a 10 para 103 acessos de mangueira conjunto de dados com apenas dados (A - moleculares) e (B - moleculares e morfológico)

Este resultado demonstra ser possível a utilização de dados fenotípicos e genótipos em conjunto e não proporcionar perdas de informação nas análises genéticas realizada no programa STRUCTURE. A consistência dos resultados neste trabalho pode corroborar com o aumento de informações disponíveis para o melhoramento de culturas perenes como a manga.

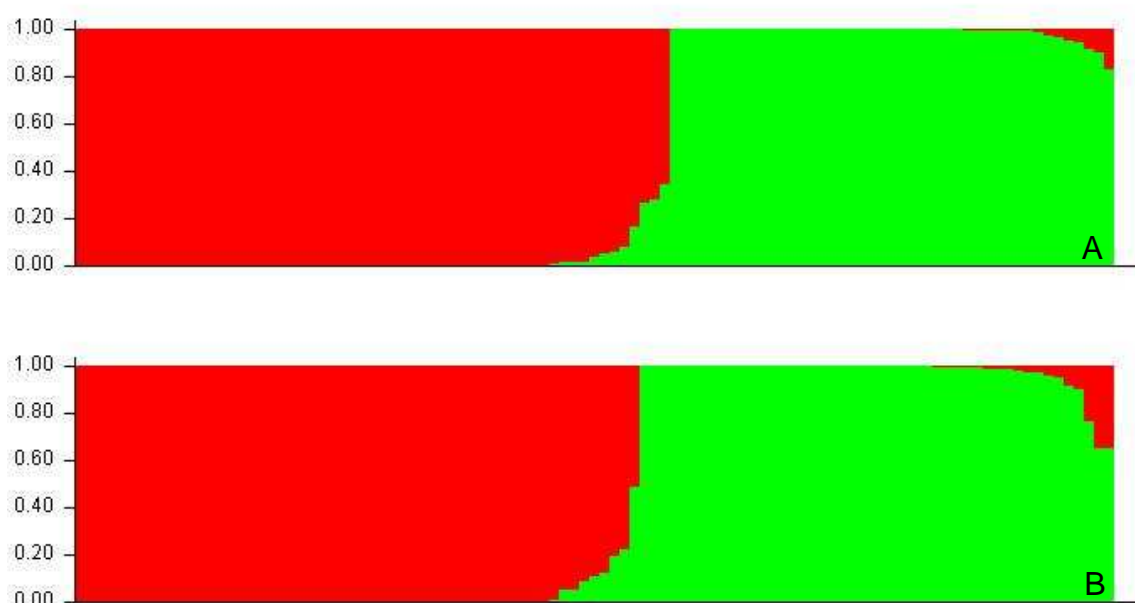


Figura 4.3 – Cento e três acessos de mangueiras alocados em dois grupos identificados na análise da estrutura populacional K=2 para os dois conjuntos de dados (apenas molecular (A); molecular e morfológico(B))

As análises realizadas no programa STRUCTURE não puderam ser comparadas com as outras análises genéticas porque o conjunto dos dados foram diferentes. Tanto no teste de otimização de Tocher e na análise de agrupamento o conjunto de dados era composto por mais 12 caracteres contínuas. No entanto, a similaridade e alocação entre os acessos (Espada, Espada 35, Espada Ouro e Rosa) brasileiros se repetiram.

As duas simulações realizadas pelo programa STRUCTURE foram consistentes como comentado anteriormente, apenas será discurtido os resultados gerados pelo conjunto (microsatélites e dados morfológicos).

O valor de K=2 apresentou o valor biológico mais adequado para o banco de germoplasma e dividiu os acessos em dois subgrupos. Um subgrupo 1 (SB1) apresentou 47 acessos brasileiros e mais dez acessos originados de outros país (dois australianos, três norte americano, dois indianos, um sul africano, um tailandês e um mexicano). O outro subgrupo (SB2) apresentou 34 cultivares norte americanos e de outros países, e mais 10 cultivares formados por híbridos brasileiros descendentes provavelmente, desses cultivares comerciais. Dentre os híbridos estão (Alfa, Beta, Haden2H, Haden rosa, BRS-ômega, Ubá, Roxa, Surpresa e Espada vermelha).

Estes dois grupos formados correspondem a dois conjuntos heteróticos distintos. Os híbridos brasileiros formaram um novo subgrupo heterótico e compõe o subgrupo (SB2 em verde) com características mais diferenciadas do que grupo formado por acessos brasileiros (SB1 em vermelho) (Figura 4.3 - B). Os híbridos agrupados com a maioria dos cultivares norte americanos são variedades mais cultivadas comercialmente. Então, esse rearranjo dos grupos com bases distintas pode ser explicada pelas duas introduções ocorridas no Brasil. A primeira realizada pelos portugueses no período Brasil colônia e o segundo momento realizado por melhoristas visando o enriquecimento da cultura no país.

Outro fato é a tentativa de realizar seleção para complementar ou agregar características desejadas para o melhoramento genético. Então o cruzamento é realizado entre cultivares para avaliar o poder de combinação entre os genótipos, sendo realizado para características qualitativas e complexas e dependendo da finalidade do programa de melhoramento. Para culturas como a manga é importante estar realizando seleção entre cultivares comerciais com acessos mais adaptados as condições climáticas brasileiras.

No estudo desenvolvido por Hirano, Oo, Watanabe (2010) com acessos de mangueira de várias partes do mundo e mais uma população de mangueira de Myanmar, pode-se observar que alguns genótipos da população de mangueira ficaram em outro grupo similar ao que aconteceu no banco de germoplasma da Embrapa. Isso pode ter ocorrido pela similaridade que alguns acessos apresentam em relação aos demais. No caso brasileiro de alguns acessos serem alocados no grupo formado por cultivares comerciais pode ser explicado pelos acessos serem híbridos, então apresentavam características próximas aos demais por descendência. E isso ocorre pela expansão do cultivo da manga em novas áreas ter envolvido adaptação para novas regiões. E foi necessária a seleção de genótipos mais adequados e hibridização de genótipos com diferentes cultivares.

Em várias regiões produtoras de manga o esforço do melhoramento é sempre desenvolver melhores cultivares. A informação precisa sobre o parentesco é necessária dentro da diversidade do germoplasma para poder auxiliar na eficiência do programa de melhoramento (PANDIT et al., 2007). A estruturação de um programa de melhoramento visa enriquecer por meio da ampliação da variabilidade genética. E para isto, a introdução e intercambio de genótipos é uma ação essencial para dar suporte ao pesquisador. No caso da manga que é uma espécie exótica, a

prospecção e coleta de materiais tradicionalmente cultivados no país, como raças locais e parentes silvestres; entre outras espécies (presentes na Índia, Filipinas, Myanmar e Tailândia) com potencial de uso futuro, ampliará significativamente a diversidade genética disponível. A identificação confiável será primordial para a caracterização e avaliação do germoplasma da mangueira aumentando o grau de variabilidade disponível. E finalmente, a eficiência das avaliações de diferenciação dos acessos entre si antecipará o potencial de cada um ante as características genéticas mais associadas resistência a doenças, ligadas a qualidade do fruto e a produtividade.

## Referencias

BALLY, I.S.E. GRAHAM; HENRY, R.J. Genetic diversity of Kensington mango in Australia. **Australian Journal Experimental Agriculture**. Collingwood, v.36, n.2, p.243-247, 2007.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3ed. Viçosa: UFV, 2006. v.1, 480p.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p. 2611-2620, 2005.

FOLEGATTI, M.I.S.; MATSUURA, F.C.A.U.; TORREZAN, R.; BOTREL, N.; SOUZA FILHO, M. DE S.M.; AZEREDO, H.M.C.; BRITO, E.S.; SOUZA NETO, M. A. Cap18, In: GENU, P.J.C.; PINTO, A.C.Q. (Eds). **A Cultura da Mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 409-431.

HIRANO, R.; OO, T.H.; WATANABE, K.N.; Myanmar mango landraces reveal genetic uniqueness over common cultivars from Florida, India, and Southeast Asia. **Genome**. Ottawa. v. 53, p.321-330. 2010.

KHAN, S.; QURESHI, M.I.; KAMALUDDIN, T.A.; ABDIN, M.Z. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. **African Journal of Biotechnology**. Nairobi. v. 6, n.3, p.175-178, 2007.

PANDIT, S. S.; MITRA, S.; GIRI, A.P.; PUJARI, K.H.; PATIL, B.P.; JAMBHALE, N.D.; GRUPTA, V. S. Genetic diversity analysis of mango cultivars using inter simple sequence repeat markers. **Current Science**. Bangalore. v.93, p.1135-1141. 2007.

PINTO, A. C. Q.; FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos e Melhoramento da Mangueira no Brasil. In: QUEIROZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds.).

### **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro.**

Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 1999. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br>  
Acesso em: 10 Maio 2009.

PINTO, A. C. Q.; ROSSETTO, C.J.; FALEIRO, F.G. Melhoramento genético da manga: métodos, resultados, limitações e estratégias. In: SIMPÓSIO DE MANGA DO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2005, Petrolina. **Anais...** Petrolina:Embrapa, 2005. 35p.

PINTO, A.C.Q. Melhoramento da magueria (*Mangifera indica* L.) no ecossistema dos Cerrados do Brasil Central por meio de Híbridização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p.369-374, 1996.

PIZZOL, S.J.; MARTINES, FILHO, J.G.; SILVA, T.H.S.; GONÇALVES, G.O. Mercado de manga no Brasil; aspectos gerais. **Preços Agrícolas**, São Paulo, v.12, p. 34-35. 1998.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N. A.; DONNELLY, P. Association mapping in structured population. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 67, n. 1 170, 181p. 2000.

QUEIROZ, M. A.; LOPES, M A. Importância dos Recursos Genéticos Vegetais para o Agronegócio. In NASS, L. L. (Ed.). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. Cap 02, p. 61-119.

RAJWANA, I.A.; KHAN, I. A.; MALIK, A.U.; SALEEM, B.A.; KHAN, A.S.; ZIAF, K.; ANWAR, R.; AMIN, M. Morphological and biochemical markers for varietal characterization and quality assessment of potencial indigenous mango (*Mangifera indica*) Germplasm. **Internacional Journal of Agriculture & Biology**, New Dali, v.13, p. 151-158, 2011.

RIBEIRO, I.C.N.S. **Análise da divergência genética em acessos de *Mangifera indica* com base em descritores Agromorfológicos e marcadores microssatélites**. 2011. 133p. Dissertação (Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SANTOS, C. A.F.; LIMA NETO, F.P.; RODRIGUES, M.A.; COSTA, J.G. Similaridade genética de acessos de mangueira de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal, v. 30, n.3, p.736-740, 2008.

SANTOS, C.A.F.; LIMA FILHO, J.M.P.; LIMA NETO, F.P. Estratégias para o Desenvolvimento de Novas Cultivares de Mangueira para o Semiárido Brasileiro. **Revista de Fruticultura Brasileira**. Jaboticabal, v. 32, p. 493-497, 2010.

SANTOS, C.A.F.; LIMA NETO, F. P. Outcrossing rate between ‘Haden’ and ‘Tommy Atkins’ mangoes estimated using microsatellite and AFLP markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.8, p.899-904, 2011.

SCHNELL, R.J.; BROWN, J.S.; OLANO, C.T.; MEEROW, A.W.; CAMPBELL, R.J. KUHN, D.N. Mango Genetic Diversity Analysis and Pedigree Infences for Florida Cultivars Using Microsatellite Markers. **American Journal Society Horticultural Science**. Alexandria, v. 131, n.2, p.214-224, 2006.



## 5 CONCLUSÕES

- A biblioteca genômica enriquecida com os SSRs foi eficiente no desenvolvimento de novos locos para *Mangifera indica* e eficientes na caracterização do germoplasma de mangueira;
- O germoplasma da mangueira apresenta um nível satisfatório de divergência gênica e riqueza alélica e essas informações são uteis na caracterização dos acessos e formação de grupos relacionados ou contrastantes;
- Os acessos foram separados em dois grandes grupos, sendo um deles formado com a maioria dos acessos brasileiros e o outro apenas com acessos norte americanos e híbridos do programa de melhoramento da Embrapa;
- A coleção nuclear manteve a riqueza alélica do banco de germoplasma de mangueira brasileiro;
- Os marcadores moleculares e morfológicos corroboram entre si e são úteis para aprimorar a caracterização do germoplasma e subsidiar os programas de melhoramento da mangueira.