

# IDENTIFICAÇÃO PARENTAL EM HÍBRIDOS DE MANGA OBTIDOS POR CRUZAMENTO ABERTO UTILIZANDO MARCADORES RAPD

M.C.R Cordeiro; A.C.Q. Pinto; V.H.V. Ramos.; F.G. Faleiro;  
L.M. Santos Fraga; J.N. Dias, G.K.B. Lopes,

Embrapa Cerrados - BR 020, km 18 - Planaltina, DF - CEP 73.310-970 -cristina@cpac.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

Atualmente a manga representa uma das maiores commodities brasileiras, cuja produção tem aumentado significativamente gerando benefícios para a economia do país (Pinto, 2002; Anuário de Frutas Brasileiras, 2004). A principal cultivar produzida para o mercado externo é a *Tommy Atkins*. Porém, esta apresenta problemas de susceptibilidade a patógenos e uma baixa qualidade de frutos. A Embrapa Cerrados iniciou um programa de melhoramento genético da manga na década de 80 em um esforço de, através da combinação de cultivares nacionais e internacionais utilizando hibridações inter-varietais, selecionar novas cultivares com características melhoradas, principalmente em relação àquelas de maior importância comercial. Este programa já logrou o lançamento de quatro novas cultivares a saber : a Alfa, a Beta, a Lita e a Roxa. As principais etapas metodológicas seguidas por este programa são o cruzamento controlado como descrito por Muckerjee (1961) seguido de avaliações agrônomicas e análises físico-químicas dos frutos. A técnica do cruzamento controlado é eficiente na obtenção de híbridos cujos parentais são plenamente conhecidos mas, resulta em um trabalho árduo, lento e muito difícil na obtenção de grandes famílias para estudos de herança genética, devido ao baixo percentual de recuperação de híbridos. Com o objetivo de superar estes problemas, foi estabelecida no campo, uma área de plantio adensada em esquema de quadrado latino com cinco importantes progenitores do programa. A hipótese desta estratégia foi de maximizar a indução da polinização aberta por meio da proximidade das copas das plantas. Para testar a eficiência do direcionamento dos cruzamentos foi utilizada a técnica do RAPD para agregar informações em um teste de paternidade.

## OBJETIVO

Realizar testes de paternidade em híbridos de manga com base em marcadores RAPD e avaliar a eficiência da polinização aberta em função da proximidade das plantas.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material genético** - as sementes híbridas foram colhidas em 2004 da cultivar Mallika na área da copa voltada para a da cultivar Roxa (Fig.1). As sementes foram colocadas para germinar em condições de viveiro (75% de sombreamento) em sacos plásticos (40 X 25 X 0,2 cm com perfurações laterais) com uma mistura de terra e areia (1:1).

**Extração de DNA** - folhas das plantas foram colhidas e imediatamente utilizadas para a extração do DNA genômico utilizando-se o método do CTAB (Doyle & Doyle, 1990) com modificações (Faleiro et al., 2003). A pureza e a concentração do DNA foi estimada em espectrofotômetro (Sambrook et al, 1989) e as amostras de DNA diluídas para 5 µg/ L. A integridade do DNA foi observada em gel de agarose 0,8%.

**Análise em RAPD** - as amostras de DNA foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) com descrita por Welsh & McClelland (1990) e Williams et al (1990) utilizando-se 26 primers (OPD1, OPD2, OPD5, OPD13, OPD18, OPD20, OPE1, OPE5, OPE6, OPE11, OPE15, OPF3, OPF5, OPF7, OPF8, OPG6, OPG12, OPG13, OPG18, OPG19, OPH4, OPH14, OPH15, OPH18, OPH19, OPH20). As amplificações foram realizadas em termociclador MJ Res. programado para 40 ciclos de : 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Ao término dos 40 ciclos foi realizado uma etapa de extensão das cadeias por 6 minutos a 72 °C. Após a amplificação as amostras foram aplicadas em um gel de agarose a 1.2% em tampão TBE (Tris-Borato 100 mM, EDTA 2 mM) que continha brometo de etídio (0.5 µg/ml). O processo eletroforético ocorreu a 85V e durou cerca de quatro horas. Ao término da corrida, os géis foram visualizados e digitalmente fotografados sob luz ultra-violeta. Cada amostra foi analisada em duplicata por cada primer.

**Análise dos dados** - Os marcadores RAPD reproduzidos nas duplicatas foram convertidos em uma matriz de dados binários e similaridades genéticas entre as plantas foram estimadas baseadas no coeficiente de Nei & Li (1979) utilizando-se o Software Genes (Cruz, 1997). Além da similaridade genética foram avaliados para o resultado final, parâmetros tais como : proximidade de plantas, época e taxa de florescimento e presença de fragmentos homólogos entre híbrido e provável progenitor masculino.

## RESULTADOS

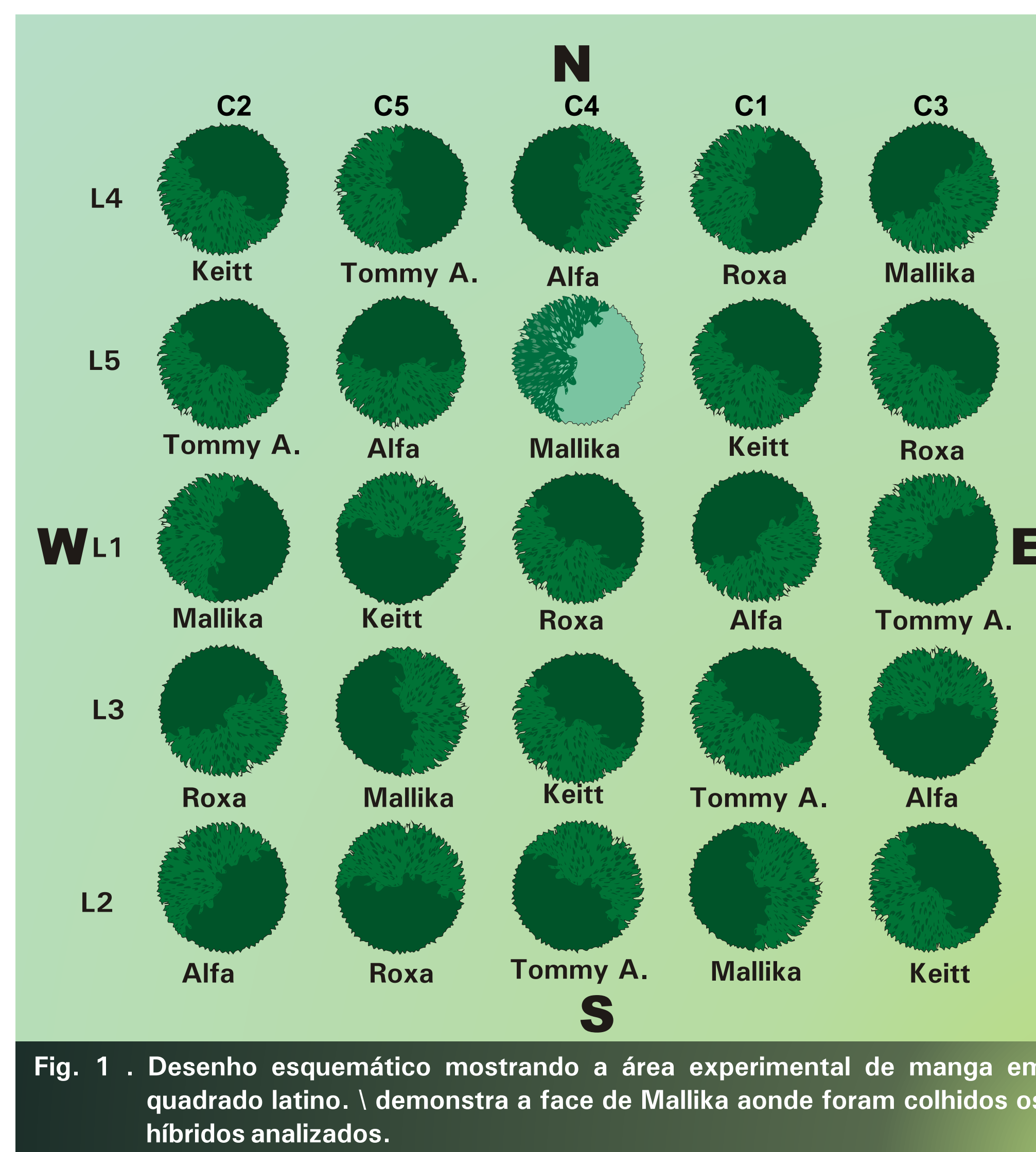


Fig. 1 - Desenho esquemático mostrando a área experimental de manga em quadrado latino. \ demonstra a face de Mallika aonde foram colhidos os híbridos analisados.

Tabela 1 - Tabela que mostra o valor de similaridade genética entre indivíduos e progenitores baseado em 134 bandas (monomórficas e polimórficas) baseado na matriz de similaridade obtida pelo coeficiente de similaridade Nei & Li (1979) utilizando-se o programa Genes (Cruz, 1997).

Progenitores/Híbridos	M1	M2
Roxa	0,77	0,9
Mallika (mãe)	0,84	0,91
Keitt	0,75	0,77
Alfa	0,83	0,87
Tommy Atkins	0,83	0,88

Tabela 2 - Tabela que demonstra o número de fragmentos homólogos entre prováveis progenitores masculinos e híbridos.

Variedade s/ Híbridos	Primers / Fragmentos homólogos																
	E6-1	E6-4	E6-6	F7-8	H14-8	H20-14	H20-15	H20-16	F8-7	E15-2	E15-4	E15-11	H15-4	H15-10	H15-11	H15-18	D18-3
Roxa	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
Keitt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alfa	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
Tommy	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
M1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
M2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0

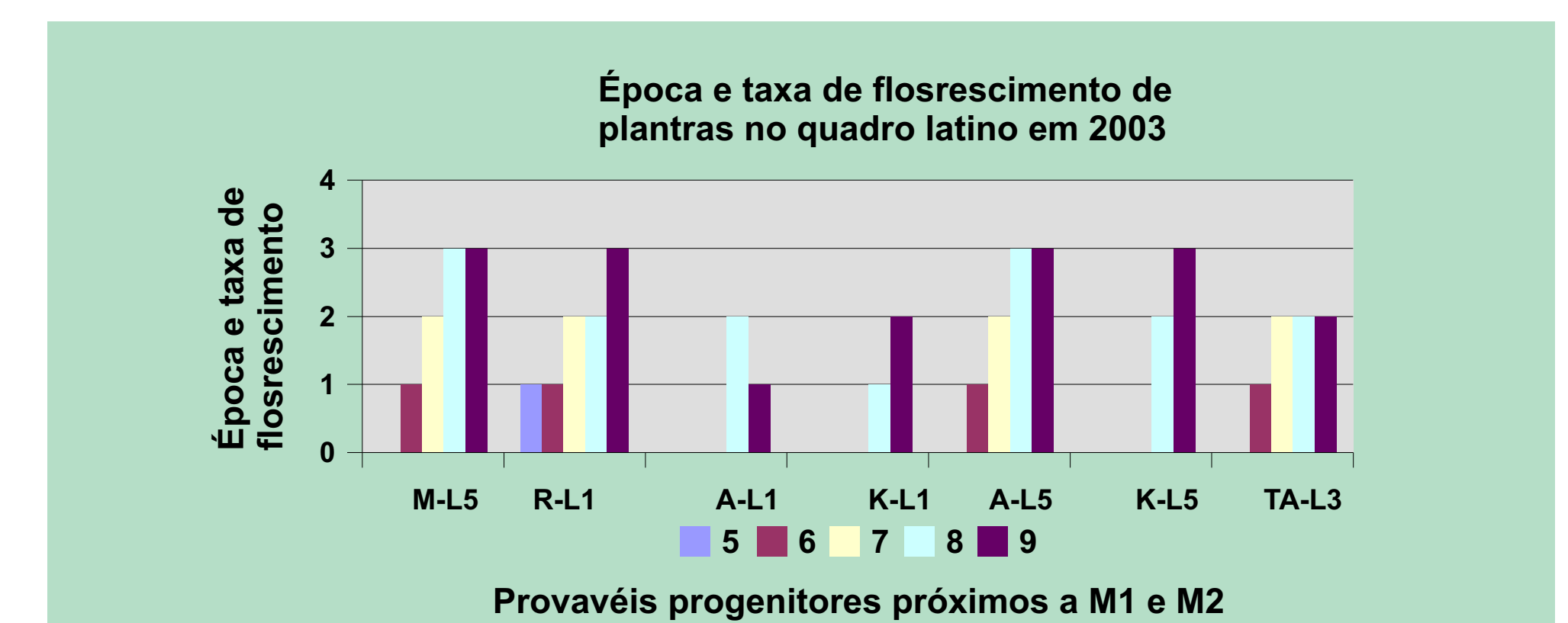


Fig. 2 - Época e taxa de Florescimento dos possíveis progenitores no Quadrado Latino - 1 - 25% de florescimento; 2 - 50% de florescimento e 3 - 100% de florescimento. 5,6,7,8 e 9 correspondem aos meses de maio a setembro.

Tabela 3 - Progenitor mais provável dos híbridos M1 e M2 com base em diferentes parâmetros.

Híbridos	M1				M2			
	Alfa	Tommy	Roxa	Keitt	Alfa	Tommy	Roxa	Keitt
Possíveis Progenitores Masculinos								
Parâmetros								
Similaridade genética	1	1	0,5	0,25	0,75	0,75	1	0,25
Proximidade de planta	0,5	0,25	1	0,5	0,5	0,25	1	0,5
Época e taxa de florescimento	1	1	1	0,25	1	1	1	0,25
Número de Fragmentos homólogos	1	0,5	0,5	0	1	0,25	0,75	0
Total	3,5	2,75	3,0	1,0	3,25	2,25	3,75	1,0

valores: 1 (muito provável); 0,75 (provável); 0,5 (probabilidade média); 0,25 (baixa probabilidade)



Fig. 4 - Produtos de amplificação em RAPD com os cinco possíveis parentais e os dois híbridos analisados utilizando o primer decâmico OPE15. As amostras foram analisadas em duplicata e somente os fragmentos reproduzíveis foram computados na matriz de dados binários.

## CONCLUSÕES

- 1 - O RAPD é uma técnica eficiente para agregar informações em um teste de paternidade de híbridos obtidos em cruzamento aberto, apresentando grande utilidade em programas de melhoramento genético de espécies perenes.
- 2 - A eficiência da estimativa na identificação parental aumenta utilizando-se os parâmetros de similaridade genética, amplificação de fragmentos homólogos entre o provável progenitor e híbrido, época e taxa de florescimento e proximidade das plantas ;
- 3 - Os cruzamentos abertos que ocorreram até o ano de 2003 não dependeram apenas da proximidade das plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anuário Brasileiro de Frutas. Brasil., p.p.30-31, 2004
- Cruz, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Ed. UFV, Viçosa, 1997. Doyle, J.J. & Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15, 1990.
- Faleiro, F.G.; Faleiro, A.S.G.; Cordeiro, M.C.R.; Karia, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados (Comunicado Técnico No.92) 6p, 2003
- Mukherjee, S.K.; Majunder, P.K.; Chatterjee, S. An improved technique of mango hybridization. Indian Journal of Horticulture. 18: 302-304, 1961.
- Nei, M. & Li, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 76: 5269-5273, 1979
- Pinto, A.C.Q; Andrade, S.R.M.D de; Amaro, A.A. & Gomes, U. Mango Industry in Brazil. Proc. 7th International Mango Symposium, Pernambuco : 41, 2002
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T., New York, 1989
- Welsh, J.; McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18: 7213-7218, 1990
- Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535, 1990