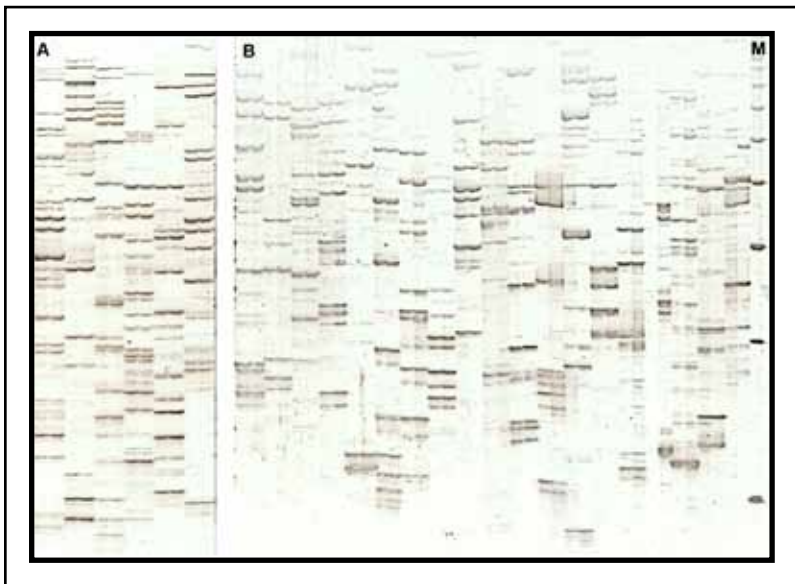


**Otimização da técnica de
AFLP para análises moleculares
no mamoeiro**



ISSN 1809-5003

Julho, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 49

Otimização da técnica de AFLP para análises moleculares no mamoeiro

*Eder Jorge de Oliveira; Juliana Leles Costa; Lucas
Ferraz dos Santos e Jorge Luiz Loyola Dantas*

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rua Embrapa - s/nº, Caixa Postal 007
44380-000, Cruz das Almas, Ba
Fone: (75) 3312-8048
Fax: (75) 3312-8097
www.cnpmf.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Aldo Vilar Trindade*

Vice-presidente: *Ana Lúcia Borges*

Secretária-executiva: *Maria da Conceição Pereira Borba dos Santos*

Membro: *Cláudia Fortes Ferreira*

Fernando Haddad

Edson Perito Amorim

Hermínio Souza Rocha

Marcio Eduardo Canto Pereira

Paulo Ernesto Meissner Filho

Supervisão editorial: *Ana Lúcia Borges*

Revisão de texto: *Paulo Ernesto Meissner Filho*

Normalização bibliográfica: *Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro*

Tratamento de ilustrações: *Anapaula Rosário Lopes*

Editoração eletrônica: *Anapaula Rosário Lopes*

Foto(s) da capa: *Eder Jorge de Oliveira*

1ª edição

versão (2011): online

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Mandioca e Fruticultura

Otimização da técnica de AFLP para análises moleculares no mamoeiro [recurso eletrônico]. / Eder Jorge de Oliveira... [et.al.]. - Dados eletrônicos. - Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 49/ Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003; 21 p.).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/boletim-de-pesquisa/documentos>

Título da página Web (acesso em 2011)

1. Mamão. 2. Melhoramento genético. 3. Marcadores moleculares. I. Oliveira, Eder Jorge. II. Série

CDD 634.651 (21.ed.)

© Embrapa 2011

Sumário

Resumo	4
Abstract	5
Introdução	6
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	11
Conclusões	20
Referências	21

Otimização da técnica de AFLP para análises moleculares no mamoeiro

*Eder Jorge de Oliveira*¹

*Juliana Leles Costa*²

*Lucas Ferraz dos Santos*³

*Jorge Luiz Loyola Dantas*¹

Resumo

O objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), bem como identificar as melhores combinações de iniciadores e enzimas para análise de polimorfismo do mamoeiro. As diluições de 1:5 e 1:25 após a ligação dos adaptadores e a etapa de pré-amplificação, respectivamente, apresentaram a melhor qualidade no padrão de amplificação, com alta intensidade de bandas e sem ambiguidade. O uso de iniciadores com duas e três bases seletivas (corte raro/corte frequente) propiciou o aparecimento de um número maior de fragmentos, sem comprometer a qualidade dos géis. Foram identificadas 52 combinações de iniciadores que apresentaram mais de 25 fragmentos por gel que podem ser utilizados nas análises posteriores de polimorfismo para os mais diversos estudos genéticos na cultura do mamoeiro.

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

¹ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas - Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua da Embrapa, s/n, Caixa Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; loyola@cnpmf.embrapa.br;

² Estudante de Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: julianaleles_17@hotmail.com;

³ Estudante de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, e-mail: lufts@hotmail.com

Optimization of AFLP for molecular analysis in papaya

Abstract

The main objective of this study was to optimize the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) protocol and identify the best combinations of primers and enzymes to detect polymorphism on papaya. The dilution of 1:5 and 1:25 after the adapter ligation and pre-amplification, respectively, showed the best quality in the amplification pattern, with high band intensity and unambiguous results. Primers with two and three selective bases (rare cutter/frequent cutter) showed a greater number of fragments without compromising the quality of the gels. Fifty-two primer combinations that showed more than 25 fragments per gel, which can be used in further polymorphisms analysis for many genetic studies in papaya, were identified.

Key-words: breeding, molecular markers, fingerprinting, *Carica papaya* L.

Introdução

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (CHEN et al., 1991). É uma cultura de expressiva importância para o Brasil, que é um dos principais produtores da fruta, com produção de 1,9 milhão de toneladas em 2008, participando com 20,8% do mercado mundial, que foi de 9,1 milhões de toneladas. Além disso, possui grande importância social por ser uma cultura geradora de emprego e renda, haja vista que absorve mão-de-obra durante o ano todo, contribuindo para o mercado de trabalho e fixação do homem à terra, já que o manejo, os tratamentos culturais, a colheita e a comercialização são efetuados de maneira contínua nas lavouras, além dos plantios serem renovados, em média, a cada dois ou três anos.

Contudo, a sustentabilidade e expansão da cultura do mamoeiro dependem do desenvolvimento de novos genótipos com características superiores para atender à constante demanda dos agricultores em virtude do restrito número de variedades disponíveis para uso comercial. Nesse cenário, a pesquisa com o mamoeiro é fundamental para o Brasil e o melhoramento genético pode contribuir de forma ativa no desenvolvimento da cultura, disponibilizando novas linhagens ou híbridos de interesse comercial.

No tocante aos estudos moleculares, poucas contribuições efetivas têm sido feitas para o melhoramento da cultura. As principais aplicações realizadas até o presente, com os marcadores moleculares no mamoeiro referem-se: i) à identificação de marcadores ligados ao sexo das plantas; ii) aos estudos filogenéticos da família Caricaceae; iii) à construção de mapas de ligação; iv) ao estudo de herança de organelas citoplasmáticas; v) identificação de genes de resistência ao vírus da mancha anelar; e vi) seleção assistida visando o desenvolvimento de linhagens.

O uso dos marcadores moleculares pode aumentar a dinâmica e a capacidade de resposta dos programas de melhoramento frente aos constantes desafios impostos ao desenvolvimento de novas cultivares de

mamoeiro. Dentre os diferentes tipos de marcadores de DNA, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) origina-se da variação do comprimento dos fragmentos de restrição amplificados seletivamente via PCR. O polimorfismo detectado pelo AFLP decorre principalmente da presença ou ausência do sítio de restrição para a enzima de corte frequente, conferindo a estas marcas um caráter dominante. Contudo, são marcadores extremamente poderosos, por permitirem a geração de um grande número de marcas com um número bastante reduzido de géis pois, neste caso, cada gel é capaz de revelar a variação em até mais de uma centena de fragmentos (locos) simultaneamente. Portanto, a técnica de AFLP reúne estratégias utilizadas pelas técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), com as vantagens de detectar múltiplos locos por reação e apresentar alta repetibilidade.

Atualmente os avanços na área da genética molecular têm levado os melhoristas de diversas culturas recorrerem às novas técnicas de melhoramento baseadas nas análises com marcadores moleculares. No caso do mamoeiro, o desenvolvimento de marcadores com características especiais como o AFLP é estratégico para aumentar a precisão da seleção e, conseqüentemente, da resposta ao processo seletivo, o que levará à melhoria na eficiência do programa de melhoramento genético no uso dos recursos genéticos e no desenvolvimento de novas variedades. Os marcadores AFLP também podem ser extremamente úteis na caracterização molecular de variedades comerciais, híbridos e suas linhagens genitoras, bem como acessos de mamoeiro dos Bancos Ativos de Germoplasma de Mamoeiro. Além disso, devido ao alto conteúdo de informação por gel, os marcadores AFLP podem ajudar no desenvolvimento de um sistema de *fingerprint* molecular capaz de diferenciar os principais genótipos comerciais e acessos de germoplasma disponível para a espécie; o que permitirá avanços no registro e proteção de cultivares.

O polimorfismo gerado por AFLP, que está associado à herança mendeliana, pode ser utilizado para diversos outros estudos genéticos do mamoeiro, como análise de parentesco, construção de mapas de ligação e análise de locos quantitativos. Entretanto, a implantação eficiente desta

metodologia requer trabalhos prévios de otimização. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de padronizar a técnica de AFLP e determinar as combinações de iniciadores com maior potencial para geração de polimorfismo.

Material e Métodos

Os trabalhos de otimização da técnica de AFLP foram realizados utilizando o DNA da variedade Sunrise Solo e do híbrido Tainung nº 1. Inicialmente, utilizou-se o protocolo originalmente descrito por Vos et al. (1995), entretanto, os resultados das amplificações não se mostraram satisfatórios, sendo necessário promover ajustes na metodologia original. Assim, testou-se este mesmo protocolo com as seguintes modificações:

Digestão do DNA

O DNA foi extraído utilizando o protocolo com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação do DNA foi realizada após eletroforese (3 Volts/cm) de alíquotas de cada amostra, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas de DNA do fago Lambda, realizada em géis de agarose a 1,0% (p/v).

Foram utilizadas duas combinações de enzimas para a digestão do DNA genômico: *EcoRI/MseI* e *PstI/MseI*. Para a combinação *EcoRI/MseI* foram utilizados 250 ng de DNA; 5,0 μL de tampão "One Phor All" 10X (OPA); 0,5 μL de solução de albumina de soro bovino (BSA) (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); 1,25 μL da enzima *MseI* (4 unidades/ μL) e 0,5 μL da enzima *EcoRI* (10 unidades/ μL). O volume foi completado para 50 μL com água ultrapura. As mesmas concentrações foram utilizadas para a combinação *PstI/MseI* exceto a enzima *PstI* (10 unidades/ μL) utilizada ao invés da *EcoRI*. As reações de restrição foram realizadas a 37 °C durante 3 horas, sendo cuidadosamente agitadas a intervalos de uma hora. Após a digestão, as reações foram submetidas a um tratamento térmico por 15 minutos a 70 °C. O resultado da digestão foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% utilizando-se 10 μL do produto da digestão.

Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e posteriormente fotografados sob luz UV.

Ligação dos adaptadores

Após a verificação da qualidade de digestão, a reação de ligação dos adaptadores foi realizada com os adaptadores da seguinte maneira: i) adaptador *EcoRI* – foram misturados: 3,4 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *EcoRI*-oligo 1 (5´CTCGTAGACTGCGTACC 3´) e 3,0 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *EcoRI*-oligo 2 (5´AATTGGTACGCAGTCTAC 3´), 6,0 μL de tampão de PCR OPA 10X (“One Phor All”) e 107,6 μL de água ultrapura; ii) adaptador *PstI* – foram misturados: 3,4 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *PstI*-oligo 1 (5´CTCGTAGACTGCGTACATGCA 3´) e 3,0 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *PstI*-oligo 2 (5´TGTACGCAGTC-TAC 3´), 6,0 μL de tampão de PCR OPA 10X (“One Phor All”) e 107,6 μL de água ultrapura; e iii) adaptador *MseI* – foram misturados: 32,0 μL (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *MseI*-oligo 1 (5´GACGATGAGTCCTGAG 3´); 28,0 μL (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *MseI*-oligo 2 (5´TACTCAGGACTCAT 3´); 7,0 μL do tampão de PCR OPA 10X (“Open Phor All”) e 53,0 μL de água ultrapura autoclavada. Após a homogeneização dos componentes, a solução foi submetida a uma sequência de 10 minutos sob 65 °C, 10 minutos sob 37 °C e 10 minutos sob 25 °C, sendo depois mantida a - 20 °C.

Para cada reação de ligação foram utilizados 2,0 μL do tampão da enzima *T4* DNA ligase 5X, 1,0 μL dos adaptadores das enzimas *EcoRI* ou *PstI*, 1,0 μL do adaptador da enzima *MseI*, 1,0 μL de *T4* DNA ligase (1 unidade/ μL), 5,0 μL de água ultrapura e 40 μL da reação da digestão descrita acima. As reações de ligação foram realizadas a 20 °C durante 3 horas, sendo cuidadosamente agitadas a intervalos de 1 hora. Após a digestão e ligação dos oligonucleotídeos adaptadores, foram testadas três diluições da solução (1:5, 1:25 e 1:50), juntamente com o produto da digestão-ligação sem diluição.

Pré-amplificação

Na reação de pré-amplificação, foram utilizados iniciadores de *EcoRI* e *MseI* ou de *PstI* e *MseI*, com extensão de 1 nucleotídeo seletivo na

extremidade 3'. Os iniciadores utilizados foram E + A/M + C e P + A/M + C, onde E = adaptador *EcoRI*; M = *MseI*; P = *PstI*; A = adenina; C = citosina; T = timina e G = guanina.

As reações de pré-amplificação foram compostas por 0,5 μL do iniciador da enzima de corte raro (E + A ou P + A) (50 ng/ μL), 0,5 μL do iniciador da enzima de corte frequente (M + C) (50 ng/ μL); 1,0 μL de dNTP 10 mM; 2,0 μL de tampão sem MgCl₂ 10X, 1,2 μL MgCl₂ 25 mM, 0,6 μL de *Taq* DNA polimerase (5,0 unidades/ μL) e 8,2 μL de água ultrapura. A esse coquetel de pré-amplificação foram adicionados 3,0 μL da solução com o DNA digerido e ligado ao adaptador.

A pré-amplificação foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 94 °C, 2 minutos (passo 1); 94 °C, 1 minuto (passo 2, desnaturação); 56 °C, 1 minuto (passo 3, hibridização); e 72 °C, 1 minuto (passo 4, extensão). Os passos 2 a 4 foram repetidos 26 vezes. O ciclo final foi seguido de 5 minutos a 72 °C. Em seguida, o DNA pré-amplificado foi diluído para as concentrações de 1:5; 1:25 e 1:50.

Amplificação seletiva

A amplificação do produto pré-amplificado com e sem as diluições anteriores foi realizada utilizando os iniciadores com duas bases seletivas para as enzimas de corte raro (E ou P + AA, AC, AG ou AT) e três para *MseI* (M + CAA, CAC, CAG, CAT, CTA, CTC, CTG e CTT), possibilitando 64 combinações de iniciadores. Também utilizou-se iniciadores com três bases seletivas para as enzimas de corte raro (E ou P + ACT, AAC, AAG, AAT, ACA, ACC, AGC, AGG, ATA, ATC, ATG e ATT) e as mesmas combinações para *MseI*, totalizando outras 192 possíveis combinações.

Nessas reações foram utilizados: 0,5 μL (50 ng/ μL) do iniciador da enzima de corte raro, 0,6 μL do iniciador da enzima de corte frequente (50 ng/ μL), 0,8 μL de dNTP 5mM, 2,0 μL de tampão da *Taq* DNA polimerase 10X, 1,2 μL de MgCl₂ 25mM, 0,32 μL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades / μL), 12,28 μL de água ultrapura autoclavada e 1,5 μL da reação de pré-amplificação com as diferentes diluições.

O programa de amplificação foi realizado de acordo com o seguinte protocolo: inicialmente uma desnaturação inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 12 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 65 °C por 30 segundos, com redução de 0,7 °C por ciclo; 72 °C por 1 minuto, seguidos por 23 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto encerrando os ciclos com 72 °C por 2 minutos.

Separação dos fragmentos de AFLP e revelação dos géis

Juntamente aos 20 μL do produto final de cada reação de amplificação, foram adicionados 10 μL da seguinte solução: 10 μL de tampão de carregamento (formamida 98%, EDTA 0,5M pH 8,0; azul de bromofenol 0,002% p/v e xileno cianol 0,002% p/v). Depois de misturadas as soluções, as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos, sendo aplicados 5 μL nos géis. O tampão TBE 1X (100 mM Tris, 100 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) foi pré-aquecido, juntamente com o gel desnaturante 6% poli(acrilamida) (6% acrilamida/bis-acrilamida (19:1) e 7.5 M de uréia) no equipamento Seq-Gen GT 38 x 50 cm.

A corrida eletroforética foi feita com potência de 60 W utilizando tampão TEB 1X. A corrida foi interrompida após 3,5 horas. Após essa etapa, o DNA foi visualizado por coloração com prata de acordo com Creste et al. (2001).

O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado a partir de uma equação de regressão obtida com base nas distâncias de migração dos fragmentos de DNA de um padrão de peso molecular de 100 pb.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com os testes iniciais foram satisfatórios para as diferentes diluições testadas. Entretanto, as diluições de 1:5 e 1:25 após a ligação dos adaptadores e a etapa de pré-amplificação, respectivamente, foram as que apresentaram melhor qualidade no padrão de

amplificação, e por isso, foram utilizadas nos passos subsequentes de análise do padrão de amplificação das combinações dos iniciadores seletivos. Com estes ajustes, as reações de AFLP apresentaram um bom padrão de visualização nos géis de poliacrilamida (Figura 1).

Além da otimização, foram testadas 64 combinações de pares de iniciadores com 2 + 3 bases seletivas (*EcoRI/MseI* + *PstI/MseI*) e 192 combinações (*EcoRI/MseI* + *PstI/MseI*), com 3 + 3 nucleotídeos seletivos na extremidade 3' (Tabelas 1 e 2).

A combinação InicEcoAG x InicMseCAT apresentou o maior número de bandas por gel (40) (Tabela 1), enquanto que a InicEcoAAT x InicMseCTG,

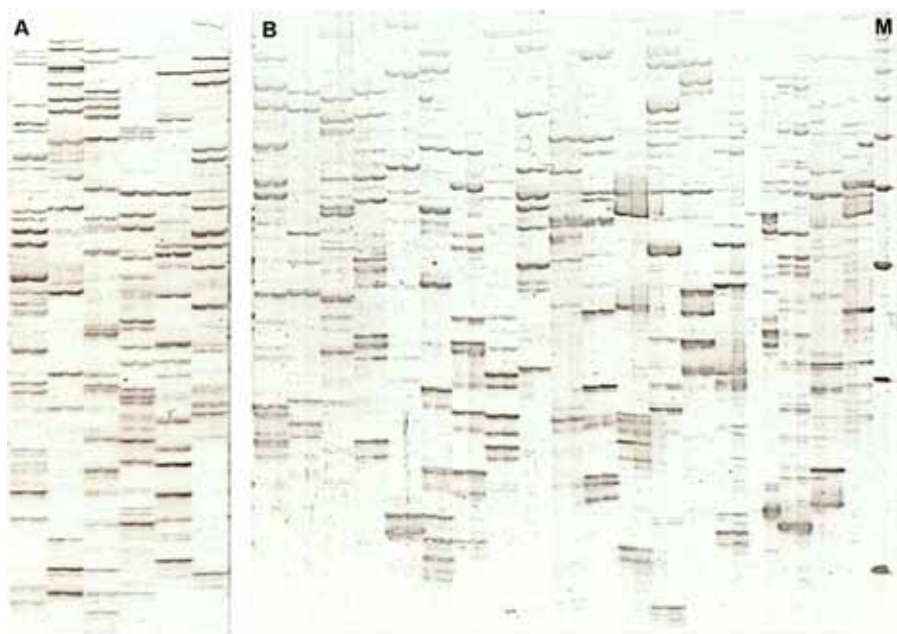


Figura 1. Resultado da amplificação seletiva para otimização de protocolo de marcadores AFLP para mamoeiro. **A:** amplificação das amostras de DNA da variedade Sunrise Solo e do híbrido Tainung n°1, digeridas com as enzimas *PstI/MseI* utilizando duas bases seletivas; **B:** amplificação das amostras de DNA da variedade Sunrise Solo e do híbrido Tainung n°1, digeridas com as enzimas *PstI/MseI* utilizando três bases seletivas; M: marcador 50 bp DNA Ladder.

o menor (6) (Tabela 2). Considerando todas as combinações avaliadas, foram obtidos em média 19,8 fragmentos por gel. Este número de bandas é reduzido considerando espécies coníferas como *Pinus* sp e *Picea* sp, em que foram obtidos de 150 a 200 bandas em gel de poliacrilamida 6%, revelado com fósforo radioativo (LERCETEAU; SZMIDT, 1999). Comparada à revelação radioativa, a coloração com nitrato de prata apresenta menor sensibilidade. Entretanto, é uma técnica bastante utilizada por ser mais rápida, dispensar o uso de salas especiais e não utilizar radioatividade (CRESTE et al., 2001).

As combinações de iniciadores com 2 + 3 bases seletivas produziram maior quantidade de fragmentos amplificados de DNA; em média cerca de 28 fragmentos por combinação tanto para as combinações das enzimas *EcoRI* e *MseI*, quanto *PstI* e *MseI*, enquanto que os iniciadores com 3 + 3 bases seletivas produziram em média, 16,7 fragmentos para a combinação *EcoRI* e *MseI*, e 17,7 fragmentos para a combinação *PstI* e *MseI* (Tabela 3).

Segundo Bleas et al. (1998), genomas pequenos, de até 107 Mpb, requerem apenas um ou dois nucleotídeos seletivos na extremidade 3' de cada iniciador para revelação do polimorfismo. Por outro lado, genomas mais complexos, de 108 Mpb requereram maior número de nucleotídeos seletivos. No caso do mamoeiro, cuja estimativa do genoma é de 372 Mpb, seriam necessários pelo menos 3 bases seletivas na extremidade 3' para reduzir o pool de DNA a ser amplificado e, por consequência, o arraste de DNA que prejudica a leitura dos géis. Entretanto, o uso de apenas duas bases seletivas nos iniciadores relacionados às enzimas de corte raro mostrou ser suficiente para a análise do polimorfismo de AFLP para o mamoeiro.

Embora seja relatada a existência de relação direta entre o número de bases A/T e C/G nos iniciadores com o número total de bandas obtidas pela técnica de AFLP, na qual quanto maior o número de bases C/G, menor o número de bandas obtidas no gel (LERCETEAU; SZMIDT, 1999), nos trabalhos de otimização desta técnica para a cultura do mamoeiro esta relação não foi observada. Por exemplo, as combinações

InicEcoAG x InicMseCAT com três bases A/T e duas C/G produziram praticamente o mesmo número de fragmentos que a combinação InicEcoAT x InicMseCTT, com 40 e 39 bandas, respectivamente. Com isso, a melhor combinação de iniciadores deve ser aquela que possui maior número de fragmentos, independente da composição nucleotídica da espécie em relação à quantidade de A/T e C/G.

Do total de combinações de iniciadores avaliadas, observou-se que 52 (20,3%) delas apresentaram mais de 25 fragmentos por gel (Tabela 1 e 2), o que demonstra o alto potencial de exploração deste tipo de marcador nas análises genéticas do mamoeiro, desde a caracterização de germoplasma, *fingerprinting* de variedades e seleção assistida.

Tabela 1. Relação do número total de bandas observadas (NTB) para as combinações de iniciadores AFLP com duas bases seletivas para as enzimas de corte raro (*EcoRI* e *PstI*) e três para corte frequente (*MseI*), na análise da variedade Sunrise Solo e do híbrido Tainung n°1.

<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>	<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>
InicEcoAA x InicMseCAA	33	InicPstAA x InicMseCAA	36
InicEcoAA x InicMseCAC	31	InicPstAA x InicMseCAC	28
InicEcoAA x InicMseCAG	29	InicPstAA x InicMseCAG	37
InicEcoAA x InicMseCAT	37	InicPstAA x InicMseCAT	36
InicEcoAA x InicMseCTA	32	InicPstAA x InicMseCTA	30
InicEcoAA x InicMseCTC	31	InicPstAA x InicMseCTC	36
InicEcoAA x InicMseCTG	18	InicPstAA x InicMseCTG	38
InicEcoAA x InicMseCTT	35	InicPstAA x InicMseCTT	32
InicEcoAC x InicMseCAA	27	InicPstAC x InicMseCAA	26
InicEcoAC x InicMseCAC	18	InicPstAC x InicMseCAC	21
InicEcoAC x InicMseCAG	22	InicPstAC x InicMseCAG	25
InicEcoAC x InicMseCAT	24	InicPstAC x InicMseCAT	24

Continua...

Tabela 1. Continuação.

<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>	<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>
InicEcoAC x InicMseCTA	27	InicPstAC x InicMseCTA	19
InicEcoAC x InicMseCTC	24	InicPstAC x InicMseCTC	21
InicEcoAC x InicMseCTG	23	InicPstAC x InicMseCTG	18
InicEcoAC x InicMseCTT	27	InicPstAC x InicMseCTT	18
InicEcoAG x InicMseCAA	23	InicPstAG x InicMseCAA	31
InicEcoAG x InicMseCAC	24	InicPstAG x InicMseCAC	23
InicEcoAG x InicMseCAG	27	InicPstAG x InicMseCAG	22
InicEcoAG x InicMseCAT	40	InicPstAG x InicMseCAT	31
InicEcoAG x InicMseCTA	24	InicPstAG x InicMseCTA	26
InicEcoAG x InicMseCTC	26	InicPstAG x InicMseCTC	14
InicEcoAG x InicMseCTG	29	InicPstAG x InicMseCTG	24
InicEcoAG x InicMseCTT	28	InicPstAG x InicMseCTT	18
InicEcoAT x InicMseCAA	34	InicPstAT x InicMseCAA	31
InicEcoAT x InicMseCAC	33	InicPstAT x InicMseCAC	26
InicEcoAT x InicMseCAG	20	InicPstAT x InicMseCAG	33
InicEcoAT x InicMseCAT	30	InicPstAT x InicMseCAT	36
InicEcoAT x InicMseCTA	30	InicPstAT x InicMseCTA	21
InicEcoAT x InicMseCTC	32	InicPstAT x InicMseCTC	33
InicEcoAT x InicMseCTG	23	InicPstAT x InicMseCTG	30
InicEcoAT x InicMseCTT	39	InicPstAT x InicMseCTT	25

Tabela 2. Relação do número total de bandas observadas (NTB) para as combinações de iniciadores AFLP com três bases seletivas para as enzimas de corte raro (*EcoRI* e *PstI*) e três para corte frequente (*MseI*), na análise da variedade Sunrise Solo e do híbrido Tainung nº1.

<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>	<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>
InicEcoACT x InicMseCAA	18	InicEcoACA x InicMseCAA	18
InicEcoACT x InicMseCAC	9	InicEcoACA x InicMseCAC	9
InicEcoACT x InicMseCAG	19	InicEcoACA x InicMseCAG	12
InicEcoACT x InicMseCAT	29	InicEcoACA x InicMseCAT	16
InicEcoACT x InicMseCTA	9	InicEcoACA x InicMseCTA	19
InicEcoACT x InicMseCTC	18	InicEcoACA x InicMseCTC	14
InicEcoACT x InicMseCTG	15	InicEcoACA x InicMseCTG	10
InicEcoACT x InicMseCTT	19	InicEcoACA x InicMseCTT	10
InicEcoAAC x InicMseCAA	12	InicEcoACC x InicMseCAA	15
InicEcoAAC x InicMseCAC	14	InicEcoACC x InicMseCAC	15
InicEcoAAC x InicMseCAG	21	InicEcoACC x InicMseCAG	19
InicEcoAAC x InicMseCAT	14	InicEcoACC x InicMseCAT	7
InicEcoAAC x InicMseCTA	12	InicEcoACC x InicMseCTA	7
InicEcoAAC x InicMseCTC	12	InicEcoACC x InicMseCTC	10
InicEcoAAC x InicMseCTG	11	InicEcoACC x InicMseCTG	7
InicEcoAAC x InicMseCTT	16	InicEcoACC x InicMseCTT	17
InicEcoAAG x InicMseCAA	20	InicEcoAGC x InicMseCAA	28
InicEcoAAG x InicMseCAC	13	InicEcoAGC x InicMseCAC	21
InicEcoAAG x InicMseCAG	22	InicEcoAGC x InicMseCAG	18
InicEcoAAG x InicMseCAT	22	InicEcoAGC x InicMseCAT	26
InicEcoAAG x InicMseCTA	12	InicEcoAGC x InicMseCTA	15
InicEcoAAG x InicMseCTC	10	InicEcoAGC x InicMseCTC	18

Continua...

Tabela 2. Continuação.

<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>	<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>
InicEcoAAG x InicMseCTG	17	InicEcoAGC x InicMseCTG	18
InicEcoAAG x InicMseCTT	18	InicEcoAGC x InicMseCTT	30
InicEcoAAT x InicMseCAA	23	InicEcoAGG x InicMseCAA	22
InicEcoAAT x InicMseCAC	18	InicEcoAGG x InicMseCAC	9
InicEcoAAT x InicMseCAG	15	InicEcoAGG x InicMseCAG	17
InicEcoAAT x InicMseCAT	21	InicEcoAGG x InicMseCAT	19
InicEcoAAT x InicMseCTA	17	InicEcoAGG x InicMseCTA	16
InicEcoAAT x InicMseCTC	16	InicEcoAGG x InicMseCTC	16
InicEcoAAT x InicMseCTG	6	InicEcoAGG x InicMseCTG	13
InicEcoAAT x InicMseCTT	18	InicEcoAGG x InicMseCTT	15
InicEcoATA x InicMseCAA	24	InicPstACT x InicMseCAA	16
InicEcoATA x InicMseCAC	9	InicPstACT x InicMseCAC	20
InicEcoATA x InicMseCAG	15	InicPstACT x InicMseCAG	13
InicEcoATA x InicMseCAT	17	InicPstACT x InicMseCAT	13
InicEcoATA x InicMseCTA	16	InicPstACT x InicMseCTA	12
InicEcoATA x InicMseCTC	15	InicPstACT x InicMseCTC	18
InicEcoATA x InicMseCTG	7	InicPstACT x InicMseCTG	18
InicEcoATA x InicMseCTT	24	InicPstACT x InicMseCTT	11
InicEcoATC x InicMseCAA	17	InicPstAAC x InicMseCAA	22
InicEcoATC x InicMseCAC	12	InicPstAAC x InicMseCAC	19
InicEcoATC x InicMseCAG	15	InicPstAAC x InicMseCAG	22
InicEcoATC x InicMseCAT	21	InicPstAAC x InicMseCAT	18
InicEcoATC x InicMseCTA	17	InicPstAAC x InicMseCTA	15
InicEcoATC x InicMseCTC	16	InicPstAAC x InicMseCTC	23
InicEcoATC x InicMseCTG	12	InicPstAAC x InicMseCTG	13

Continua...

Tabela 2. Continuação.

<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>	<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>
InicEcoATC x InicMseCTT	22	InicPstAAC x InicMseCTT	19
InicEcoATG x InicMseCAA	19	InicPstAAG x InicMseCAA	14
InicEcoATG x InicMseCAC	17	InicPstAAG x InicMseCAC	19
InicEcoATG x InicMseCAG	18	InicPstAAG x InicMseCAG	18
InicEcoATG x InicMseCAT	28	InicPstAAG x InicMseCAT	20
InicEcoATG x InicMseCTA	20	InicPstAAG x InicMseCTA	13
InicEcoATG x InicMseCTC	19	InicPstAAG x InicMseCTC	13
InicEcoATG x InicMseCTG	17	InicPstAAG x InicMseCTG	15
InicEcoATG x InicMseCTT	22	InicPstAAG x InicMseCTT	19
InicEcoATT x InicMseCAA	30	InicPstAAT x InicMseCAA	22
InicEcoATT x InicMseCAC	20	InicPstAAT x InicMseCAC	17
InicEcoATT x InicMseCAG	17	InicPstAAT x InicMseCAG	15
InicEcoATT x InicMseCAT	22	InicPstAAT x InicMseCAT	14
InicEcoATT x InicMseCTA	22	InicPstAAT x InicMseCTA	14
InicEcoATT x InicMseCTC	16	InicPstAAT x InicMseCTC	18
InicEcoATT x InicMseCTG	16	InicPstAAT x InicMseCTG	10
InicEcoATT x InicMseCTT	20	InicPstAAT x InicMseCTT	20
InicPstACA x InicMseCAA	20	InicPstATA x InicMseCAA	14
InicPstACA x InicMseCAC	11	InicPstATA x InicMseCAC	27
InicPstACA x InicMseCAG	15	InicPstATA x InicMseCAG	16
InicPstACA x InicMseCAT	14	InicPstATA x InicMseCAT	17
InicPstACA x InicMseCTA	14	InicPstATA x InicMseCTA	15
InicPstACA x InicMseCTC	12	InicPstATA x InicMseCTC	16
InicPstACA x InicMseCTG	8	InicPstATA x InicMseCTG	16
InicPstACA x InicMseCTT	14	InicPstATA x InicMseCTT	16

Continua...

Tabela 2. Continuação.

<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>	<i>Combinações</i>	<i>NTB</i>
InicPstACC x InicMseCAA	10	InicPstATC x InicMseCAA	20
InicPstACC x InicMseCAC	16	InicPstATC x InicMseCAC	16
InicPstACC x InicMseCAG	11	InicPstATC x InicMseCAG	12
InicPstACC x InicMseCAT	23	InicPstATC x InicMseCAT	20
InicPstACC x InicMseCTA	23	InicPstATC x InicMseCTA	13
InicPstACC x InicMseCTC	23	InicPstATC x InicMseCTC	23
InicPstACC x InicMseCTG	17	InicPstATC x InicMseCTG	16
InicPstACC x InicMseCTT	20	InicPstATC x InicMseCTT	14
InicPstAGC x InicMseCAA	30	InicPstATG x InicMseCAA	21
InicPstAGC x InicMseCAC	21	InicPstATG x InicMseCAC	23
InicPstAGC x InicMseCAG	20	InicPstATG x InicMseCAG	27
InicPstAGC x InicMseCAT	17	InicPstATG x InicMseCAT	12
InicPstAGC x InicMseCTA	23	InicPstATG x InicMseCTA	18
InicPstAGC x InicMseCTC	16	InicPstATG x InicMseCTC	19
InicPstAGC x InicMseCTG	18	InicPstATG x InicMseCTG	17
InicPstAGC x InicMseCTT	23	InicPstATG x InicMseCTT	21
InicPstAGG x InicMseCAA	15	InicPstATT x InicMseCAA	25
InicPstAGG x InicMseCAC	18	InicPstATT x InicMseCAC	20
InicPstAGG x InicMseCAG	21	InicPstATT x InicMseCAG	23
InicPstAGG x InicMseCAT	16	InicPstATT x InicMseCAT	22
InicPstAGG x InicMseCTA	20	InicPstATT x InicMseCTA	25
InicPstAGG x InicMseCTC	23	InicPstATT x InicMseCTC	16
InicPstAGG x InicMseCTG	18	InicPstATT x InicMseCTG	16
InicPstAGG x InicMseCTT	17	InicPstATT x InicMseCTT	23

Tabela 3. Relação do número de bandas (maior, menor e média) obtidos com as combinações de iniciadores de AFLP.

Bandas por combinação	Combinação de iniciadores*			
	<i>E</i> + <i>NN</i> / <i>M</i> + <i>NNN</i>	<i>P</i> + <i>NN</i> / <i>M</i> + <i>NNN</i>	<i>E</i> + <i>NNN</i> / <i>M</i> + <i>NNN</i>	<i>P</i> + <i>NNN</i> / <i>M</i> + <i>NNN</i>
Maior	40,0	38,0	30,0	30,0
Menor	18,0	14,0	6,0	8,0
Média	28,1	27,5	16,7	17,7

*E = adaptador *EcoRI*; M = *MseI*; P = *PstI*; N = qualquer uma das bases nitrogenadas (A, C, T ou G)

Conclusões

1. As diluições de 1:5 e 1:25, após a ligação dos adaptadores e pré-amplificação, respectivamente, proporcionaram melhor qualidade na amplificação dos locos de AFLP;
2. O uso de duas e três bases seletivas (corte raro/corte frequente) foi suficiente para permitir a detecção de maior número de fragmentos, podendo ser utilizada para as mais diversas análises genéticas do mamoeiro;
3. Não há relação entre composição de nucleotídeos nos iniciadores com número de bandas de AFLP geradas no mamoeiro;
4. Existem 52 combinações de iniciadores de AFLP com capacidade de geração de mais de 25 fragmentos por gel com alta intensidade e sem ambiguidade.

Agradecimentos

Os pesquisadores agradecem à Fapesb e ao CNPq pelo apoio financeiro do projeto e concessão das bolsas de iniciação científica.

Referências

BLEARS, M. J.; DE GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its application. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p.99 -114, 1998.

CHEN, M. H.; CHEN, C. C.; WANG, D. N.; CHEN, F. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p.1913 -1918, 1991.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

LERCETEAU, E.; SZMIDT, A.E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. **Heredity**, v.82, p.252-260, 1999.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

Embrapa

Mandioca e Fruticultura

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA