

Similaridade Genética entre Acessos de Mangueira com Base em Marcadores AFLP e Microssatélites



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
135**

**Similaridade Genética entre Acessos de
Mangueira com Base em Marcadores
AFLP e Microssatélites**

*Carlos Antonio Fernandes Santos
Francisco Pinheiro Lima Neto*

***Embrapa Semiárido
Petrolina, PE
2018***

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>
Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido
BR 428, km 152, Zona Rural
Caixa Postal 23
CEP 56302-970, Petrolina, PE
Fone: (87) 3866-3600
Fax: (87) 3866-3815

Comitê Local de Publicações

Presidente
Flávio de França Souza

Secretária-Executiva
Lúcia Helena Piedade Kill

Membros
Diana Signor Deon, Elder Manuel Moura Rocha, Francislene Angelotti, Gislene Feitosa Brito Gama, José Mauro da Cunha e Castro, Juliana Martins Ribeiro, Mizael Félix da Silva Neto, Pedro Martins Ribeiro Júnior, Roseli Freire de Melo, Sidinei Anunciação Silva, Tadeu Vinhas Voltolini.

Supervisão editorial
Sidinei Anunciação Silva

Revisão de texto
Sidinei Anunciação Silva

Normalização bibliográfica
Sidinei Anunciação Silva

Tratamento das ilustrações
Nivaldo Torres dos Santos

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Nivaldo Torres dos Santos

1ª edição: 2018

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 Semiárido

Santos, Carlos Antonio Fernandes.

Similaridade genética entre acessos de mangueira com base em marcadores AFLP e microssatélites / por Carlos Antonio Fernandes Santos, Francisco Pinheiro Lima Neto. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2018.

23 p. il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Semiárido; ISSN 1808-9968, 135).

1. Genética vegetal. 2. Banco de germoplasma. 3. Manga. 4. *Mangifera indica*. I. Santos, Carlos Antonio Fernandes. II. Lima Neto, Francisco Pinheiro. III. Título. IV. Série.

CDD 634.44

© Embrapa, 2018

Sumário

| | |
|-----------------------------|----|
| Resumo | 6 |
| Abstract | 8 |
| Introdução..... | 9 |
| Material e Métodos..... | 10 |
| Resultados e Discussão..... | 14 |
| Conclusões..... | 21 |
| Referências | 22 |

Similaridade Genética entre Acessos de Mangueira com Base em Marcadores AFLP e Microsatélites

Carlos Antonio Fernandes Santos¹

Francisco Pinheiro Lima Neto²

Resumo – Estimativas de similaridade genética entre 112 acessos de mangueira (*Mangifera indica* L.), de diferentes origens geográficas, estabelecidos no Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido foram obtidas com base em marcadores AFLP e microsatélites de forma a auxiliar atividades de melhoramento e manejo de recursos genéticos dessa espécie. O DNA dos acessos foi extraído de acordo com o protocolo CTAB 2x. Dendrogramas UPGMA foram gerados usando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, com 50 alelos de 12 microsatélites e 157 amplicons AFLP de 13 combinações de *primers* EcoRI/ MseI. As correlações cofenéticas foram de 0,81, 0,80 e 0,94 para os dendrogramas de AFLP, microsatélites e AFLP + microsatélites, respectivamente. Quatro possíveis grupos foram observados no dendrograma de AFLP: grupo 1 com Amrapali, Malika, híbridos da Embrapa Cerrados e alguns acessos americanos; grupo 2 com acessos americanos e alguns acessos da África do Sul e do Brasil; grupo 3 com acessos brasileiros e alguns acessos da Austrália, Índia e Estados Unidos e grupo 4 com acessos de Espada, Rosa e outros de diferentes origens. Três grupos foram obtidos no dendrograma de microsatélite, ponto de corte de 0,42: grupo 1 com acessos predominantemente estrangeiros; grupo 2 com acessos brasileiros e grupo 3 com o acesso Dashehari. O dendrograma de AFLP + microsatélites apresentou dois grupos principais, ponto de corte de 0,48, sem relação de origem geográfica. Os acessos analisados apresentaram coeficiente de similaridade variando de 30% a 35% nos três dendrogramas, sugerindo alta variabilidade na coleção estudada. Baseado na forma de agrupamentos dos

¹Engenheiro-agrônomo, PhD. em Melhoramento Vegetal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

dendrogramas, a análise com microssatélites isolada apresentou melhor resolução biológica, pois foi possível separar os acessos brasileiros dos acessos estrangeiros, de introdução recente.

Palavras-chave: *Mangifera indica*, inter-relações entre acessos, acessos brasileiros.

AFLP and microsatellites similarities among mango accessions

Abstract – Genetic similarity among 112 mango accessions of different geographic origins of the Embrapa germplasm field collection was estimated based on AFLP and microsatellite molecular markers in order to guide breeding and management of genetic resource of this species. The DNA of the accessions was extracted according to the CTAB protocol. UPGMA dendrograms were generated using Jaccard coefficients of the distance matrixes based on 50 alleles of 12 microsatellite loci and 157 amplicons obtained from 13 AFLP EcoRI/MseI *primer* combinations. The cophenetic values were 0.81, 0.80 and 0.94 for the AFLP, microsatellite and AFLP + microsatellite dendrograms, respectively. Four probable groups were observed in the AFLP dendrogram: 1) Amrapali, Malika, Embrapa-CPAC hybrids and some American accessions forming a group, 2) other built, predominantly, by American accessions, with some inclusions of South African and Brazilian hybrids, 3) a large group composed by Brazilian accessions, with some inclusion of Australian, Indian and American accessions, and 4) a group with some accessions of Espada, Rosa and others of different origins. Three groups were observed in the microsatellite dendrogram at 0.42 cut point: the first was formed predominantly by foreign accessions, the second was formed by Brazilian accessions, and the Dashehari accession was isolated from the others. The AFLP + microsatellite dendrogram presented two groups, at 0.48 cut point, without any geographic relationship. The analyzed accessions presented variability from 30% to 35% in the three dendrograms, suggesting a high genetic variability among the mango accessions analyzed. Based on the grouping patterns, the isolated microsatellite study presented a better resolution, since it was possible to separate the Brazilian accessions from foreigner ones.

Key words: *Mangifera indica*, accessions relationship, Brazilian accessions.

Introdução

A mangueira (*Mangifera indica*, $2n=2x=40$) é uma espécie originária da parte oriental da Índia (Duval et al., 2005). Índia, China, Tailândia, Indonésia, México, Paquistão e Brasil responderam por 71% da produção mundial em 2012, enquanto México, Índia, Tailândia e Brasil foram os maiores exportadores, respondendo por quase 50% das exportações mundiais, estimada em 1,47 milhões de t (Unctad, 2016). Em 2015, o Brasil produziu 976,8 mil de toneladas de manga em uma área 64.305 hectares, sendo os estados da Bahia e Pernambuco responsáveis por 53% da produção total (IBGE, 2017), com exportações brasileiras de 156,3 mil toneladas de frutas frescas, no valor de US\$ 184,34 milhões (Abrafrutas, 2018).

Marcadores de DNA têm sido aplicados em manga principalmente para estabelecer inter-relações entre cultivares (Krishna; Singh, 2007). Marcadores microssatélites são os melhores para estudos de *fingerprinting* devido ao polimorfismo, codominância e reprodutibilidade. Duval et al. (2005), Honsho et al. (2005), Schnell et al. (2006) e Viruel et al. (2005) publicaram 65 microssatélites para mangueira. Marcadores microssatélites que possibilitam a genotipagem de indivíduos são considerados superiores aos marcadores dominantes como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), sendo esperada uma maior contribuição ao melhoramento e manejo de recursos genéticos com análises de SSR, pois são codominantes, multialélicos, altamente reprodutíveis, com ampla resolução e são baseados na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). De qualquer forma, ainda são publicados trabalhos com AFLP em análises de similaridade de acessos de mangueira, com poucos estudos fazendo comparações da sua eficiência quando comparado com marcadores microssatélites.

No século 16, os portugueses, por meio de contatos comerciais, transportaram sementes e mudas de mangueira da Índia para a África e depois introduziram no Brasil, que foi o primeiro país a cultivar a espécie nas Américas (Simão, 1971). Para Pinto et al. (2002), diversas variedades resultaram no Brasil devido ao modo de reprodução associado com a boa adaptação às condições locais, principalmente no Norte e Nordeste. No Brasil, essa espécie está presente em 22 estados, com as regiões Nordeste e Sudeste respondendo por quase 70% e 28% da área cultivada, respectivamente (IBGE, 2017).

Além da classificação por local de origem, variedades de mangueira são também classificadas de acordo com o modo de reprodução, em monoembriônicas e poliembriônicas. As sementes das primeiras têm apenas um embrião zigótico, enquanto as do segundo tipo apresentam, além do embrião zigótico, outros de origem nucelar (Viruel et al., 2005).

Um dos mais expressivos bancos de mangueira no Brasil é o da Embrapa Semiárido, atualmente com mais de 150 acessos (Silva et al., 2010). Ainda segundo esses autores, esse banco é provavelmente a maior coleção brasileira da espécie, sendo composto por variedades crioulas, como também por variedades introduzidas de outros países como Estados Unidos, México, Israel, Índia, Tailândia, África do Sul, Austrália e Filipinas.

A caracterização e a avaliação de germoplasma, além de proporcionar melhor conhecimento do que se tem disponível, permitem a identificação de acessos duplicados, possibilitando assim a eliminação de alguns. Por meio da caracterização dos acessos, têm sido obtidos grandes avanços, o que tem possibilitado conhecer e organizar os bancos ativos de germoplasma (Ferreira; Pinto, 1998).

O objetivo deste trabalho foi estimar similaridade entre acessos de mangueira de diferentes origens geográfica estabelecidos no Banco de Germoplasma da Embrapa Semiárido, com base em marcadores AFLP e microssatélites de forma a auxiliar atividades de melhoramento e recursos genéticos dessa espécie para o Semiárido brasileiro.

Material e Métodos

Foram coletadas folhas sadias de 112 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de mangueira da Embrapa Semiárido, instalado no Campo Experimental de Mandacaru, Juazeiro, BA. Duas outras espécies do gênero *Mangifera*, *M. foetida* e *M. similis* foram incluídas para análise, como unidades taxonômicas externas ao grupo nas análises de AFLP (Tabela 1).

Tabela 1. Acessos da Coleção do Banco Ativa de Germoplasma (BAG) de Mangueira da Embrapa Semiárido avaliados com marcadores AFLP e microsatélites.

| Acessos | Origem | Acessos | Origem |
|-----------------|---------------|-------------------|---------------|
| Alphonso | Índia | Juazeiro III | Brasil |
| Amarelinha | Brasil | Juazeiro IV | Brasil |
| Ametista | Brasil | Juazeiro V | Brasil |
| Amrapali | Índia | Juazeiro VI | Brasil |
| Aplle DCG 406 | Tailândia | Juazeiro VII | Brasil |
| Ataulfo | México | Lita | Embrapa |
| Beta | Embrapa | Keitt | EUA |
| Bhadauram | Índia | Kensington | Austrália |
| Black Java | Austrália | Kent | EUA |
| Bonita | Brasil | Langra | Índia |
| Bourbon | Brasil | M-13269 | EUA |
| Brasil | Brasil | Maçã | Brasil |
| Calmon | Brasil | Mallika | Índia |
| Carabao | Filipinas | Manga d'água | Brasil |
| Carlotoão | Brasil | <i>M. foetida</i> | Tailândia |
| Caxangá | Brasil | <i>M. similis</i> | Tailândia |
| Chené | África do Sul | Manguito | Brasil |
| China | Brasil | Manila | Filipinas |
| Comprida Roxa | Brasil | Manzanillo | México |
| Coração Magoado | Brasil | Mastruz | Brasil |
| CPAC 07/166-86 | Brasil | Maya | Mexico |
| CPAC 09/137-86 | Brasil | Momi-K | EUA |
| CPAC 09/166-86 | Brasil | Mon Amon | Tailândia |
| CPAC 10/2786 | Brasil | Morais | Brasil |
| CPAC 10/2886 | Brasil | Nego não chupa | Brasil |
| CPAC 10/4486 | Brasil | Néldica | África do Sul |
| CPR | Brasil | Olour | Índia |
| Dama de Ouro | Brasil | Palmer | EUA |
| Da Porta | Brasil | Papo de Peru I | Brasil |
| Dashehari | Índia | Papo de Peru II | Brasil |

Continua...

Continuação.

| Duncan | EUA | Parwin | EUA |
|------------------|---------------|------------------|---------------|
| Acessos | Origem | Acessos | Origem |
| Edward | EUA | Pêssego | Brasil |
| Eldon | EUA | Pêssego DPV | Brasil |
| Espada | Brasil | Pingo de OuroDPV | Brasil |
| Espada 35 | Brasil | Primor Amoreira | Brasil |
| Espada Itaparica | Brasil | Princesa | Brasil |
| Espada Manteiga | Brasil | Recife | Brasil |
| Espada Ouro | Brasil | Rosa | Brasil |
| Extrema | Brasil | Rosary | Brasil |
| Favo de Mel | Brasil | Ruby | EUA |
| Florigon | EUA | Salitre | Brasil |
| Foice | Brasil | Sta Alexandrina | Brasil |
| GI Proc 006/85 | Brasil | Scuper Many | EUA |
| Haden | EUA | Simmonds | EUA |
| Haden 2H | Brasil | Smith | EUA |
| Haden Rosa | Brasil | Surpresa | Brasil |
| Heidi | África do Sul | Tommy Atkins | EUA |
| Hilda | Brasil | Torbet | EUA |
| Imperial I | Brasil | Tyler Premier | EUA |
| Imperial II | Brasil | Ubá | Brasil |
| Ipuçaba | Brasil | Umbu | Brasil |
| Irwin | EUA | Winter | EUA |
| Itamaracá | Brasil | Van Dyke | EUA |
| Itiúba | Brasil | Zill | EUA |
| Joa | África do Sul | 65 | EUA |
| Juazeiro II | Brasil | | |

O DNA foi extraído das folhas usando-se o protocolo CTAB 2x de Doyle e Doyle (1990), modificado para: 6.000 e 10.000 rpm na primeira e na segunda centrifugação, respectivamente; betamercaptoetanol a 2% e incubação a 60 °C, durante 30 minutos, para todas as amostras. Após a adição do tampão Tris-EDTA, a solução de DNA foi tratada com RNase para remover RNAs coisolados. A quantificação e a análise de integridade do DNA foram realizadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Para as análises de AFLP, o DNA genômico foi diluído para 30 ng/mL e duplamente digerido com as combinações de enzimas de restrições EcoRI e MseI. Após a pré-amplificação, cada reação foi então diluída 20 vezes em água ultrapura e armazenada em geladeira. Foram realizadas reações seletivas de amplificação em volume final de 10 µL, de acordo com as concentrações: 0,2 µM do *primer* da EcoRI, 0,3 µM do *primer* da MseI, 0,2 mM de dNTPs, 1x tampão de PCR (reação em cadeia da polimerase), 2,5 mM de MgCl₂, 0,05 unidades de Taq DNA Polimerase (Biosystem, Paraná) e 2,0 µL do DNA pré-amplificado.

Foram avaliados 28 locos de microssatélites publicados por Duval et al. (2005) e 15 outros publicados por Schnell et al. (2006) em cinco acessos do BAG para a seleção daqueles de melhor resolução em géis de poliacrilamida. As reações de amplificação PCR foram realizadas em volume final de 20 µL contendo 20 ng de DNA, 0,2 µM de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1x tampão de PCR e 0,75 unidades da enzima Taq DNA polimerase. A programação do termociclador para as amplificações consistiu de: a) um ciclo inicial de 94 °C durante 4 minutos, seguido 32 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, de 56 °C durante 60 segundos e 72 °C durante 60 segundos e um ciclo final a por 4 minutos.

As reações de PCR foram aquecidas durante 3 minutos a 94 °C, na presença de formamida, e imediatamente colocadas em gelo antes da aplicação nos géis de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada por um período de 2 horas, a 60 W. Os géis foram corados com nitrato de prata conforme descrito por Creste et al. (2001). Todas as atividades foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Semiárido, em Petrolina, PE.

O índice de similaridade de Jaccard foi adotado para estimar a distância para cada par individual dos acessos estudados. A matriz de similaridade foi usada para a construção do dendrograma, de acordo com o método de agrupamento não ponderado, com base na média aritmética – UPGMA, disponível no software NTSYS (Rohlf, 1989).

Resultados e Discussão

Foram obtidas 157 e 54 bandas polimórficas e monomórficas, respectivamente, de AFLP, em 13 combinações de iniciadores (CI) EcoRI/MseI, com média de 12,1 marcas polimórficas/CI. A correlação cofenética entre a matriz dos valores cofenéticos e a matriz de similaridade de AFLP foi de 0,81, indicando que o dendrograma produzido foi uma boa representação dos dados de AFLP (Figura 1). Outra boa indicação do ajuste do dendrograma de AFLP foi a formação de um grupo à parte com os dois acessos do gênero *Mangifera*, *M. foetida* e *M. similis*.

O dendrograma de AFLP foi de difícil interpretação, com a formação de vários agrupamentos, se adotado um ponto de corte, sendo possível a interpretação de cinco grupos, considerando-se a posição sequencial dos acessos (Figura 1): 1) grupo formado por cultivares indianas, como Amrapali, Malika, oito híbridos da Embrapa Cerrados (CPAC) e seguindo até Van Dike; 2) grupo formado, predominantemente, por cultivares americanas (de Scuper Many até Chene); 3) grande grupo formado por cultivares brasileiras (de Hilda até Papo-de-Peru), com algumas inclusões de cultivares australianas, indianas e americanas; 4) outro nível sequencial de 'Pêssego' até 'Black Java'; 5) um grupo formado pelos dois acessos: *M. foetida* e *M. simillis*, incluídos previamente neste estudo como unidades extra grupos, para inferências sobre a validade do dendrograma de AFLP construído. Todos os 105 acessos, de diferentes origens geográficas, diferentes tipos de reprodução e estudados com as 157 marcas AFLP, apresentaram similaridade superior a 35% (Figura 1), o que evidencia a alta variabilidade genética da coleção de germoplasma de mangueira estudada (Tabela 1).

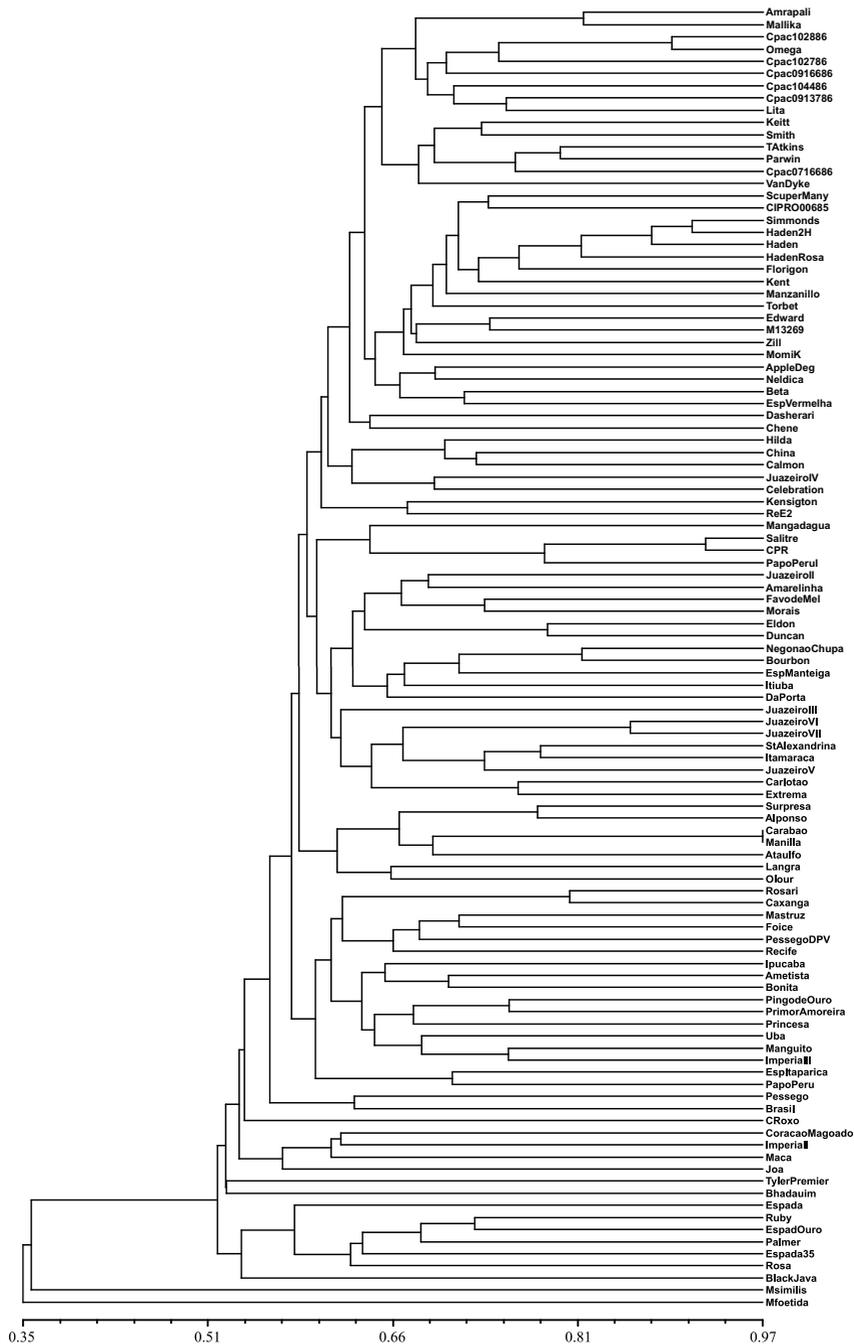


Figura 1. Dendrograma UPGMA baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard de 107 acessos do Banco de Germoplasma de Mangueira da Embrapa Semiárido analisados com 157 marcas de AFLP. Correlação cofenética = 0,81.
Fonte: Santos et al. (2008).

As cultivares Haden, Haden 2H e Haden Rosa, agrupadas com similaridades maiores do que 80% no grupo 2, são, provavelmente, resultantes de recombinações sexuadas, porque os 20% de dissimilaridade verificados dificilmente poderiam ser explicados por mutações somáticas. Viruel et al. (2005) reportaram resultados semelhantes para 'Davis Haden', que tem sido erroneamente considerada como sendo uma mutação somática de 'Haden', mas que, segundo os autores, a hipótese mais provável é que a variedade Davis Haden seja uma progênie da Haden.

Das 53 cultivares brasileiras, oriundas de recombinações genéticas espontâneas desde a época da sua introdução no País, 43 foram agrupadas quase que sequencialmente no terceiro grupo, sendo 'Salitre' e 'CPR' as que apresentaram a maior similaridade dentro deste grupo (Figura 1). Segundo Pinto et al. (2002), as cultivares brasileiras são resultantes da introdução de genótipos filipinos, geralmente fibrosos e poliembriônicos, efetuada pelos portugueses no século 16. Dentro do terceiro agrupamento, observaram-se algumas cultivares de origem semelhante formando subgrupos, como: 1) Celebration, Kensigton e R2E2, de origem australiana; 2) Carabao e Manilla, da raça filipínica, apresentaram a maior similaridade (97%), sugerindo que são quase geneticamente idênticas, corroborando os estudos de RAPD de López-Valenzuela et al. (1997). Ataulfo, outra cultivar mexicana de origem filipínica, posicionou-se próxima de Manilla e Carabao, com 68% de similaridade.

Entre os 28 locos microsatélites desenvolvidos por Durval et al. (2005) foram obtidas amplificações polimórficas de fácil interpretação em apenas sete: mMiCIR001, mMiCIR003, mMiCIR010, mMiCIR027, mMiCIR028, mMiCIR030 e mMiCIR036. Dos 15 microsatélites desenvolvidos por Schnell et al. (2005), amplificações de fácil interpretação foram observadas para os marcadores: MiSHRS-1, MiSHRS-4, MiSHRS-29, MiSHRS-32 e MiSHRS-39.

Foram detectados 50 alelos nos 12 microsatélites analisados, em que o número de alelos por loco variou de dois a nove, com média de 4,17 alelos por microsatélite nos 103 acessos de mangueira genotipados. O tamanho dos alelos variou de 192 pb no MiSHRS-4 a 1141 pb no MiSHRS-39. O maior número de genótipos observados foi com o microsatélite mMiCIR030, enquanto a maior diversidade de alelos genes observada também foi com esse microsatélite.

A correlação entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz das distâncias de similaridade dos alelos de microssatélites foi 0,70, o que indica que o dendrograma produzido (Figura 2) apresenta algumas inconsistências nos agrupamentos dos 103 acessos de mangueira com os 50 alelos dos 12 locos de microssatélites. Essa baixa correlação cofenética pode ter sido provocada pela presença de empates de valores na matriz de similaridade.

Os acessos apresentaram coeficiente de similaridade entre 30% e 100%, o que sugere alta variabilidade genética da coleção de germoplasma de mangueira estudada (Figura 2). Schnell et al. (1995), analisando 25 acessos de cultivares majoritariamente da Flórida (EUA), encontraram similaridade superior a 64%, enquanto Viruel et al. (2005) observaram similaridade superior a 33% em 28 acessos de mangueira de diversas origens, o que também evidencia a alta variabilidade genética da mangueira para o último estudo.

Foram observados três grupos no dendrograma SSR (Figura 2), no ponto de corte de 0,42: grupo I – indo de Scuper Many até Beta, grupo II – indo de Rosari até Espada Manteiga, e grupo III – formado exclusivamente por Dashehari. O grupo I foi formado por acessos predominantemente estrangeiros ou resultado de cruzamentos entre os mesmos, como os acessos Beta e Alfa, com inclusões de seis acessos brasileiros: Maça, Surpresa, Juazeiro II, Umbu, Ipuçaba e Pingo de Ouro DPV. O grupo II foi formado por acessos que devem a sua origem à longa adaptação, desde a introdução da mangueira no Brasil. Outros estudos devem ser realizados para elucidar a posição isolada do acesso Dashehari, originado da Índia, bem como dos seis acessos de origem notadamente brasileira no grupo dos acessos introduzidos recentemente de outros países.

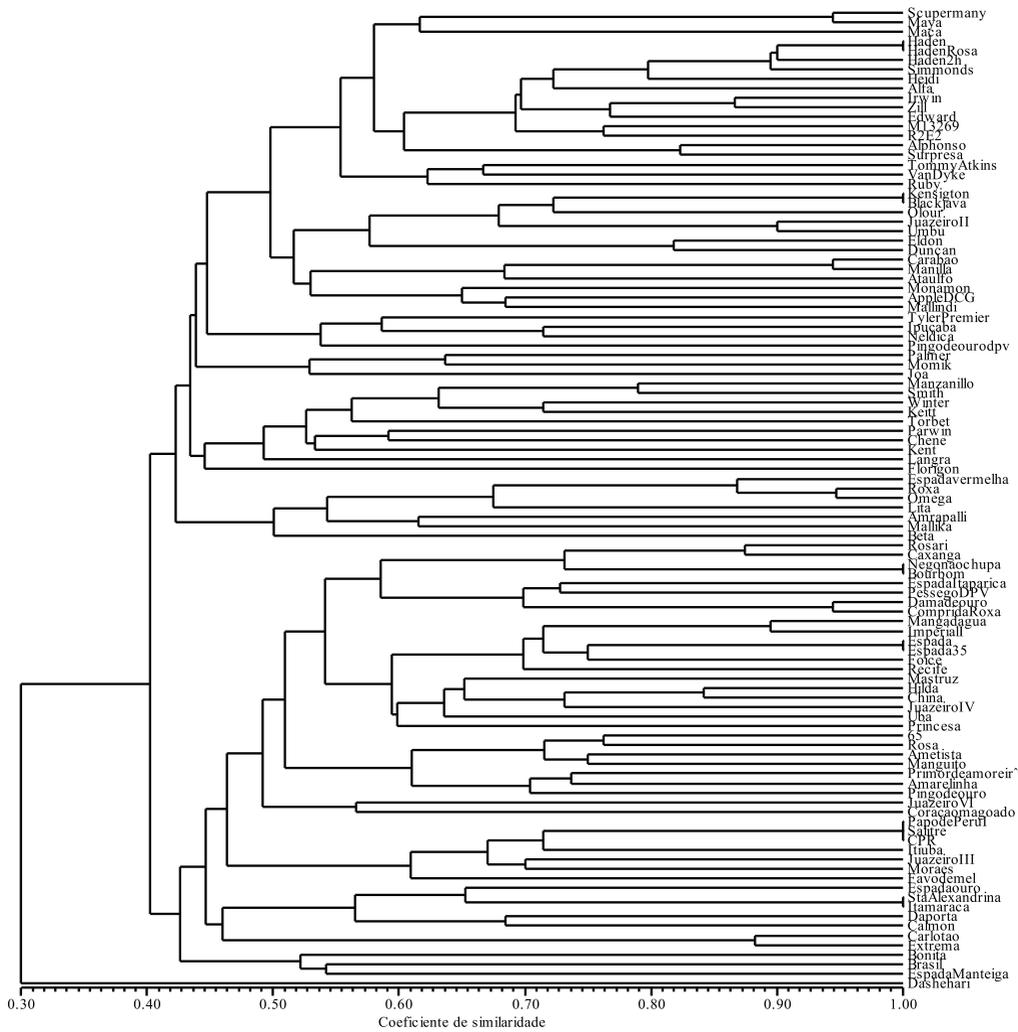


Figura 2. Dendrograma UPGMA baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard de 103 acessos do Banco de Germoplasma de Mangueira da Embrapa Semiárido genotipados para 50 alelos de 12 locos microsatélites. Correlação cofenética = 0,70. Ponto de corte: 0,42.
 Fonte: Ribeiro et al. (2012).

Os acessos Carabao e Manilla, considerados como geneticamente idênticos na análise de AFLP, por apresentaram similaridade de 97,0%, e por López-Valenzuela et al. (1997), analisando com RAPD, apesar de apresentaram alta similaridade neste estudo (96%) não devem ser considerados como tal, pois foram diferenciados pelo microssatélite MiSHRS-29.

Os 50 alelos dos 12 locos SSR não foram suficientes para separar todos os 103 acessos de mangueira, sugerindo a existência de duplicatas na coleção para os seguintes acessos: Haden Rosa e Haden; Kensington e Black Java; Nego não Chupa e Bourbon; Espada e Espada 35; Papo de Peru I, Salitre e CPR, e por último, Santa Alexandrina e Itamaracá (Figura 2). Sugere-se a avaliação desses acessos com outros locos de microssatélites para a confirmação, ou não, de que são duplicatas na coleção de germoplasma. Santos et al. (2010) diferenciaram 44 acessos de cebola (*Allium cepa* L.) com apenas 13 locos de microssatélites. Priolli et al. (2002) também diferenciaram 184 cultivares de soja (*Glycine max* L.) com a aplicação de apenas 12 marcadores microssatélites.

O dendrograma com os dados moleculares de AFLP + microssatélites apresentou dois grupos principais, no ponto de corte de 0,48, diferentes dos agrupamentos observados nas análises individuais desses marcadores. Nesse dendrograma, os dois grupos apresentaram acessos sem nenhuma relação de origem geográfica, mas com alta correlação cofenética (0,94) (Figura 3). Diferente desse resultado, Gálvez-Lopez et al. (2009) reportaram similar forma de agrupamento para 112 acessos provenientes de 16 estados mexicanos analisados com marcadores AFLP e microssatélites.

Gálvez-Lopez et al. (2009) em um estudo feito em mangueira no México relataram que seis locos microssatélites produziram 151 alelos. Os autores ainda reportaram que análises com 269 amplicons de AFLP e os 151 alelos de microssatélites indicaram alta similaridade genética, sendo o germoplasma analisado submetido à seleção constante e propagação clonal, o que pode ter reduzido sua diversidade genética. Singh e Bhat (2009) analisaram 241 genótipos de mangueira com 18 locos microssatélites, detectando um total de 103 alelos, com uma média de 5,78 alelos por loco, variando três a nove alelos por loco. Os valores de similaridade de Jaccard entre os diferentes genótipos variaram de 0,024 a 0,808 com uma média de 0,258, indicando, no geral, a presença de diversidade genética elevada no germoplasma analisado.

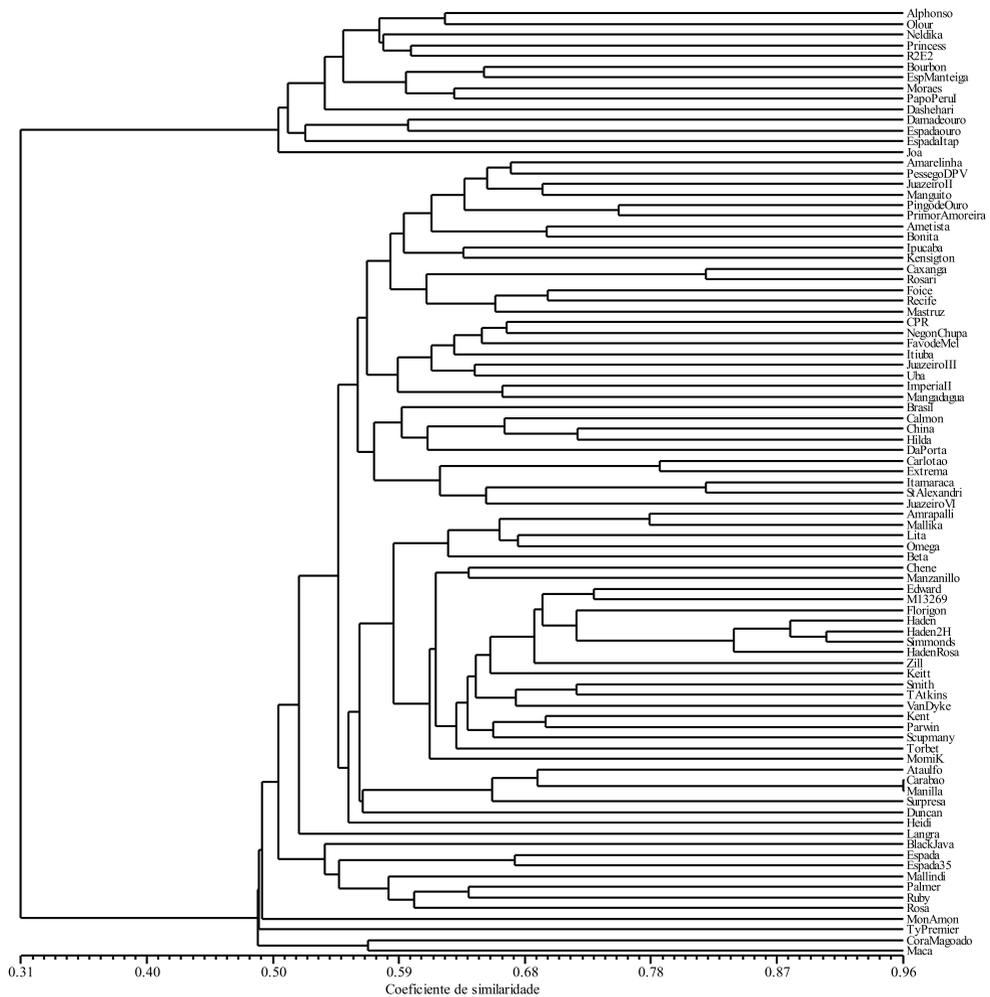


Figura 3. Dendrograma UPGMA do coeficiente de similaridade de Jaccard de 89 acessos do Banco de Germoplasma de Mangueira da Embrapa Semiárido genotipados para 50 alelos de 12 locos microssatélites e 157 marcas de AFLP. Correlação cofenética = 0,94. Ponto de corte = 0,48.

Os quase 400 anos de introdução e cultivo da mangueira no Brasil desencadearam recombinações genéticas espontâneas em sucessivas gerações, que possibilitaram a atuação de algum tipo de seleção natural ou artificial para os mais diversos caracteres bióticos e abióticos. Pinto et al. (2002) descrevem algumas das principais cultivares de mangueira brasileira. Considerando-se essa premissa, é esperado que os acessos brasileiros sejam consistentemente posicionados em diferentes grupos.

Em algumas situações, os marcadores microssatélites podem apresentar informações adicionais quando descritores morfológicos são insuficientes para distinguir cultivares de uma espécie que apresenta base genética estreita (Priolli et al., 2002). Nas situações em que não for possível distinguir acessos de uma dada espécie com um conjunto de marcadores preestabelecidos, marcadores adicionais podem ser utilizados para revelar polimorfismos. Iniciadores adicionais, além dos testados neste trabalho, podem ser obtidos em Viruel et al. (2005).

Conclusões

A análise com microssatélites + AFLP resultou em dois grupos sem nenhuma relação geográfica, sugerindo que a associação desses marcadores não foi vantajosa. Os agrupamentos visualizados no dendrograma com microssatélites isolados apresentaram melhor resolução biológica, pois foi possível separar os acessos brasileiros dos acessos estrangeiros, de introdução recente.

As análises com microssatélites apresentaram os resultados esperados, pois os acessos brasileiros de mangueira têm longo tempo de adaptação e seleção no País, remontando ao século 16. Dessa forma, marcadores microssatélites que possibilitam a genotipagem de acessos de mangueira são mais informativos do que o marcador dominante AFLP, sendo esperado uma maior contribuição ao melhoramento e manejo de recursos genéticos com as análises dos microssatélites, para essa importante cultura do agronegócio brasileiro.

Referências

- ABRAFRUTAS. **Estatística das exportações de frutas 2015/2016**. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<http://abrafrutas.org/2018/07/18/estatisticas-de-exportacoes-de-frutas-2015-2016/>>. Acesso em: 2017.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.
- DUVAL, M. F.; BUNEL, J.; SITBON, C.; RISTERUCCI, A. M. Development of microsatellite markers for mango (*Mangifera indica* L.). **Molecular Ecology Resources**, v. 5, n. 4, p. 824-826, 2005.
- FERREIRA, F. R.; PINTO, A. C. Q. Tropical and subtropical fruits genetic resources in Brasil. In: MESFIN MEETING IN FRUIT PRODUCTION, 2., 1997, Madeira, Portugal. **Proceedings**. Portugal: FAO: Gobierno de Canarias, 1998. p. 39-62.
- GÁLVEZ-LOPEZ, D.; HERNÁNDEZ-DELGADO, S.; GONZÁLEZ-PAZ, M.; BECERRA-LEOR, E. N.; SALVADOR-FIGUEROA, M.; MAYEK-PÉREZ, N. Genetic analysis of mango landraces from Mexico based on molecular markers. **Plant Genetic Resources**, v. 7, n. 3, p. 244-251, 2009.
- HONSHO, C.; NISHIYAMA, K.; EIADTHONG, W.; YONEMORI, K. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango *Mangifera indica*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 152-154, 2005.
- IBGE. **Produção agrícola municipal**. [Rio de Janeiro], 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 4 jul. 2018.
- KRISHNA, H.; SINGH, S. K. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement: a review. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 223-243, 2007.
- LOPEZ-VALENZUELA, J. A.; MARTINEZ, O.; PAREDES-LOPEZ, O. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. **HortScience**, v. 32, n. 6, p. 1105-1108, 1997.
- PINTO, A. C. de Q.; COSTA, J. G. da; SANTOS, C. A. F. Principais variedades. In: GENÚ, P. J. de C.; PINTO, A. C. de Q. (Ed.). **A cultura da mangueira**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 93-116.
- PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JÚNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 185-193, 2002.
- RIBEIRO, I. C. N. S.; SANTOS, C. A. F.; LIMA NETO, F. P. Allelic database and accession divergence of a Brazilian mango collection based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 4564-4574, 2012.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 1.80. Setauket: Exeter Software, 1989.
- SANTOS, C. A. F.; LIMA NETO, F. P.; RODRIGUES, M. A.; COSTA, J. G. da. Similaridade genética de acessos de mangueira de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 736-740, 2008.

- SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L.C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45: 49-55, 2010.
- SCHNELL, R. J.; BROWN, J. S.; OLANO, C. T.; MEEROW, A. W.; CAMPBELL, R. J.; KUHN, D. N. Mango genetic diversity analysis and pedigree inferences for Florida cultivars using microsatellite markers. **HortScience**, v. 41, n. 4, p. 214-224, 2006.
- SCHNELL, R. J.; KNIGHT JUNIOR, R. J. Frequency of zygotic seedlings from five polyembryonic mango rootstocks. **Acta Horticulture**, v. 27, p. 174-176, 1992.
- SCHNELL, R. J.; RONNING, C. M.; KNIGHT, R. J. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 269-274, 1995.
- SILVA, F. A.; SANTOS, C. A. F.; ARAÚJO, F. P. de; MOREIRA, J. N.; FERREIRA, M. A. J. F.; LEÃO P. C. de S.; DIAS, R. de C. S.; ALBUQUERQUE, S. G. de. Recursos genéticos vegetais conservados na Embrapa Semiárido. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. da (Ed.). **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. p. 277-315.
- SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura**. São Paulo: Ceres, 1971.
- SINGH, S.; BHAT, K. V. Molecular characterization and analysis of geographical differentiation of Indian mango (*Mangifera indica* L.) germplasm. **Acta Horticulture**, v. 839, p. 599-606, 2009.
- UNCTAD. **Mango: an INFOCOMM commodity profile**. New York, 2016. Disponível em: <http://unctad.org/en/PublicationsLibrary/INFOCOMM_cp07_Mango_en.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2017.
- 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**, v. 15, n. 4, p. 383-393, 2005.

Embrapa

Semiárido



CGPE 15060