

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO

IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES  
MINISSATÉLITES PARA O MAMOEIRO

GILMARA ALVARENGA FACHARDO OLIVEIRA

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

FEVEREIRO - 2015

IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES  
MINISSATÉLITES PARA O MAMOEIRO

**GILMARA ALVARENGA FACHARDO OLIVEIRA**

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2013

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

**Orientador: Prof. Dr. JORGE LUIZ LOYOLA DANTAS**

**Coorientador: Prof. Dr. EDER JORGE DE OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS - BA - 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Gilmara Alvarenga Fachardo

Identificação, caracterização e validação de marcadores minissatélites para o mamoeiro / Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira. - Cruz das Almas, 2015.

99 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas.

Coorientador: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira.

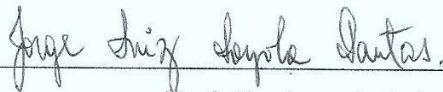
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2015.

1. Mamão. 2. Marcador molecular. 3. Melhoramento vegetal. I. Dantas, Jorge Luiz Loyola. II. Oliveira, Eder Jorge de. III. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. IV. Título.

CDD: 634.651 - 21. ed.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS  
VEGETAIS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
GILMARA ALVARENGA FACHARDO OLIVEIRA



Prof. Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas  
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF  
(Orientador)



Dr. Cláudio Antônio Ferreira de Melo  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Dra. Edna Lobo Machado  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos  
Genéticos Vegetais em....., conferindo o Grau de Mestre em  
Recursos Genéticos Vegetais em.....

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu esposo Eder, meu maior incentivador.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela presença constante em minha vida;

À minha família, pelo amor imensurável;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), e especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV), representados por todos os professores e funcionários, pela oportunidade de realização deste curso;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), pelo apoio institucional e infraestrutura de trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida;

Ao meu orientador, pesquisador Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas, pela confiança em mim depositada e apoio de toda ordem;

Ao meu coorientador, pesquisador Dr. Eder Jorge de Oliveira, pelos conhecimentos ofertados e inúmeras correções;

Aos companheiros de jornada e em especial à toda turma do Laboratório de Biologia Molecular pela amizade e ajuda. Vocês são especiais;

A Virgínia, pelo apoio e amizade sincera;

A Tininha, pela constante companhia e demonstração de carinho;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente participaram desta conquista.

***Muito obrigada!***

*De tudo ficaram três coisas...  
A certeza de que estamos começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos  
antes de terminar...  
Então, façamos da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro!*

**Fernando Sabino**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	1
<b>Capítulo 1</b>	
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES MINISSATÉLITES PARA O MAMOEIRO.....	14
<b>Capítulo 2</b>	
INFORMATIVIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E MINISSATÉLITES PARA ANÁLISES GENÉTICAS NA CULTURA DO MAMOEIRO.....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88



## IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES MINISSATÉLITES PARA O MAMOEIRO

Autora: Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas

Coorientador: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Resumo:** A identificação de polimorfismos em espécies com baixa variabilidade molecular como o mamoeiro (*Carica papaya* L.) é um desafio para a pesquisa. Assim, o objetivo desse estudo foi identificar, caracterizar e validar o polimorfismo de marcadores minissatélites visando o manejo, conservação e uso dos recursos genéticos do mamoeiro. O genoma depositado no banco de dados foi utilizado para identificação de locos minissatélites com motivos de 6 a 500 pares de bases (pb). Foram identificados 1.730 minissatélites com no mínimo seis repetições (média de 1 a cada 156Kb), cujo conteúdo médio de GC foi de 28,84% e média de 9,27 repetições por loco. Motivos com até 20 bases foram os mais frequentes (71,5%). O polimorfismo de 82 minissatélites foi avaliado em 24 acessos de mamoeiro e comparado com marcadores microsatélites, cujos resultados demonstraram a presença de 3,10 e 3,57 alelos por loco, respectivamente. Maior heterozigosidade esperada ( $H_e=0,52$ ), observada ( $H_o=0,16$ ), conteúdo de informação polimórfica ( $PIC=0,47$ ) e diversidade de Shannon-Wiener ( $H'=1,10$ ) foi verificada nos microsatélites em comparação com os minissatélites ( $H_e=0,42$ ,  $H_o=0,11$ ,  $PIC=0,38$  e  $H'=0,85$ , respectivamente), possivelmente em função do hermafroditismo da maioria dos acessos avaliados. Contudo, a probabilidade de exclusão de paternidade e de identidade foi elevada para ambos os marcadores. Com relação à estrutura populacional, ambos marcadores indicaram a organização do germoplasma em dois grupos ( $K=2$ ), embora os minissatélites tenham apontado a presença de uma subestrutura ( $K=4$ ). Este é um dos primeiros trabalhos relacionado ao desenvolvimento de minissatélites para o mamoeiro, cujo menor polimorfismo em comparação com os microsatélites pode ser compensado pelo melhor poder de discriminação dos alelos e maior acurácia na identificação genotípica dos indivíduos.

**Palavras chave:** *Carica papaya* L., melhoramento vegetal, marcadores moleculares, microsatélites.

## IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND VALIDATION OF PRIMERS MINISATELLITES FOR PAPAYA

Author: Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira

Adviser: Prof. Dr. Jorge Luiz Loyola Dantas

Coadviser: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Abstract:** Identification of polymorphisms in species with low molecular variability, such as papaya (*Carica papaya* L.) is a challenge for research. The study aimed to identify, characterize and validate the polymorphism of minisatellite markers for the management, conservation and use of papaya's genetic resources. The genome deposited in database was used to identify minisatellite loci with motifs of 6-500 base pairs (bp). 1730 minisatellites were identified with at least six repetitions (in average 1 out of 156KB), whose average GC content was 28.84% and average of 9.27 repetitions per locus. Motifs with up to 20 bases were the most common (71.5%). Polymorphism of 82 minisatellites was evaluated in 24 papaya accessions and compared with microsatellite markers, whose results demonstrated the presence of 3.10 and 3.57 alleles per locus, respectively. Higher expected heterozygosity ( $H_e = 0.52$ ), observed ( $H_o = 0.16$ ), polymorphic information content ( $PIC = 0.47$ ) and Shannon-Wiener diversity ( $H' = 1.10$ ) was observed in the microsatellites comparing with the minisatellite ( $H_e = 0.42$ ,  $H_o = 0.11$ ,  $PIC = 0.38$  and  $H' = 0.85$ , respectively), possibly due to the hermaphroditism on most accessions. However, the probability of paternity exclusion and identity was high for both markers. Regarding population structure, both markers indicated the organization of germplasm into two groups ( $K = 2$ ), although the minisatellites have indicated the presence of a subframe ( $K = 4$ ). This is one of the first work related to the development of minisatellite for papaya, whose lower polymorphism compared to microsatellite may be offset by its best discriminating power of alleles and greater accuracy in the genotypic identification of individuals.

**Keywords:** *Carica papaya* L., plant breeding, molecular markers, microsatellites.

## INTRODUÇÃO

### A cultura do mamoeiro

O mamoeiro pertence à classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricineae, família Caricaceae e gênero *Carica*. A espécie *Carica papaya* L. é a única conhecida comercialmente, sendo considerada uma das principais fruteiras consumidas no mundo (COSTA; PACOVA, 2003). Trata-se de uma planta diploide, com  $2n = 18$  cromossomos (MING et al., 2008).

Segundo Badillo (1993), o mamoeiro apresenta sistema radicular pivotante com ramificações laterais. O caule é do tipo herbáceo lenhoso, fistuloso nas regiões dos entrenós, suculento, ereto, contendo numerosas cicatrizes foliares, terminando com um grupo denso de grandes folhas na região apical. As folhas são verdes e alternadas, com grandes limbos foliares. Os pecíolos são fistulosos e cilíndricos. Os frutos apresentam tamanhos variados, e conforme sua forma são classificados como ovóides, esféricos ou piriformes. A cor da polpa pode variar entre amarela, alaranjada ou avermelhada e o tamanho das sementes varia de 5 a 7 mm. O embrião é reto, com cotilédones ovóides e achatados, circundados por endosperma carnoso, rico em ácidos graxos. A germinação é relativamente rápida e epígea.

Seu cultivo ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BADILLO, 2000). Contudo, cinco países se destacam na produção da fruta, sendo eles a Índia, o Brasil, a Indonésia, a Nigéria e o México. Em uma estimativa global, realizada em 2013, a produção mundial chegou a 11,5 milhões de toneladas, sendo que no Brasil foram plantados 35.531 hectares, chegando a uma produção de 1,85 milhão de toneladas (FAO, 2013).

A exploração comercial do mamoeiro no Brasil teve início no estado de São Paulo, nos anos 60 (RUGGIERO et al., 2011). A grande demanda pela fruta

contribuiu para que o cultivo se expandisse para diversos estados. Atualmente, o mamoeiro é cultivado em quase todo o território brasileiro.

Os elementos climáticos que mais influenciam o cultivo do mamoeiro são a disponibilidade de água, temperatura e umidade relativa do ar. A cultura apresenta um bom desenvolvimento em locais com precipitação pluviométrica de 1.500 mm anuais, bem distribuídas, temperatura média anual de 25°C e umidade relativa entre 60% e 85%. Os solos de textura média, profundos, permeáveis e com bom teor de matéria orgânica são os mais indicados para plantio (MAPA, 2011).

Segundo dados do IBGE (2013), o rendimento médio de uma lavoura de mamoeiro no Brasil é de 48,47 t ha<sup>-1</sup>. A sua produção é concentrada nos Estados do Espírito Santo e da Bahia, onde a produtividade média das lavouras, em 2012, chegou a 68,50 t ha<sup>-1</sup> e 58,74 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

Apesar de ser um grande produtor de mamão, a participação brasileira na exportação ainda está muito aquém do desejado, pois a quantidade que foi colocada no mercado internacional em 2010 corresponde a 1,45% da produção nacional (SOUZA, 2013). Isso ocorre, principalmente, devido ao grande consumo da fruta no país.

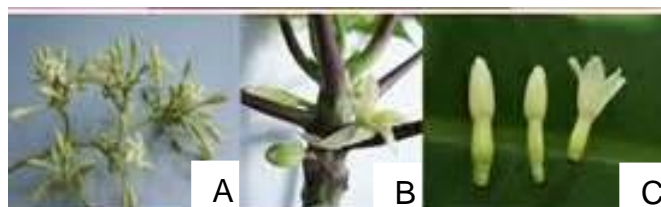
O crescimento do agronegócio do mamão no Brasil, ao longo dos anos, tem sido favorecido por um desenvolvimento tecnológico crescente e isso aumenta o potencial brasileiro de exportação da fruta. Entretanto, ainda existem muitos entraves que influenciam na expansão da cultura, a exemplo das doenças e das poucas cultivares disponíveis para plantio que atendam às exigências dos mercados interno e externo.

As variedades de mamoeiro mais exploradas comercialmente no Brasil pertencem aos grupos Solo e Formosa. As variedades do grupo Solo são representadas por linhagens (Sunrise Solo e Golden), enquanto as variedades do grupo Formosa correspondem a híbridos F<sub>1</sub> (Tainung nº 1 e Calimosa). Os frutos produzidos por essas variedades apresentam polpa avermelhada, mas diferem no tamanho do fruto. As variedades do grupo Formosa produzem frutos médios e são mais adequadas à comercialização no mercado interno, enquanto que as do grupo Solo produzem frutos de tamanho pequeno, sendo preferidos para exportação (DANTAS; OLIVEIRA, 2009).

Devido ao limitado número de cultivares plantadas nas principais regiões produtoras, a cultura do mamoeiro apresenta uma base genética estreita (DANTAS; LIMA, 2001). Assim, a sustentabilidade e expansão das lavouras dependem do surgimento de novas variedades, o que se torna possível com a ampliação e melhor uso dos recursos genéticos.

### **Biologia reprodutiva**

O mamoeiro possui três formas florais típicas: flores masculinas, femininas e hermafroditas, que dão origem a plantas masculinas (andróicas), plantas femininas (ginóica) e plantas hermafroditas (andromonóica), respectivamente, conforme Figura 1 (MEDINA; CORDEIRO, 1994).



**Figura 1:** Formas florais do mamoeiro: flores masculinas (A), femininas (B) e hermafroditas (C).

O sexo das flores determina os diferentes formatos dos frutos do mamoeiro. As plantas masculinas não produzem frutos e quando o fazem, não apresentam valor comercial. As plantas femininas geram frutos de formato arredondado ou ligeiramente ovalados, de baixo valor comercial. Já as plantas hermafroditas produzem frutos valorizados no mercado, sendo estas utilizadas na maioria dos plantios comerciais (COSTA; PACOVA, 2003).

Segundo Dantas e Castro Neto (2000), existem vários tipos de flores hermafroditas, a exemplo da pentandra, intermediária e alongada. A flor hermafrodita do tipo alongada é responsável pela produção dos frutos com maior valor comercial. Esse tipo de flor apresenta diâmetro pequeno, sempre em ráculos de pedúnculos curtos e corola gamopétala, com tubo tão longo quanto as pétalas. Os estames são todos funcionais, em número de dez, dispostos em duas séries no ápice do tubo da corola, sendo cinco alternados às pétalas e cinco opostos. O pistilo em geral tem cinco carpelos e os ovários alargados na base,

com diâmetro muito menor que o da flor pistilada. O fruto apresenta formato alongado e com cavidade interna pequena em relação à polpa.

A expressão sexual nas plantas é controlada por um único gene, com três formas alélicas ( $m$ ,  $M1$  e  $M2$ ). As plantas femininas são geneticamente homozigotas para o alelo  $m$  e as plantas masculinas e hermafroditas são heterozigotas para os alelos  $M1$  e  $M2$ , respectivamente, formando as combinações:  $mm$  (plantas femininas),  $M1m$  (plantas masculinas) e  $M2m$  (plantas hermafroditas) As combinações  $M1M1$  e  $M2M2$  não existem porque são letais zigóticos (HOFMEYR, 1967).

Contudo, são possíveis quatro tipos de cruzamento. O cruzamento entre flor feminina x flor masculina produzirá sementes que irão originar 50% de plantas masculinas e 50% de plantas femininas, aproximadamente. No cruzamento entre flor hermafrodita x flor feminina, as sementes produzidas deverão dar origem a 50% de plantas hermafroditas e 50% de plantas femininas. As sementes oriundas do cruzamento entre flor masculina x flor hermafrodita produzirão uma geração de descendentes em uma proporção de aproximadamente 33% de plantas hermafroditas, 33% de plantas masculinas e 33% de plantas femininas. Já no cruzamento entre flores hermafroditas, ou seja, quando ocorre autofecundação, é esperado que as sementes produzam mamoeiros na proporção de 2:1 entre plantas hermafroditas e femininas. Assim, esse tipo de cruzamento é o desejável em condições de cultivos comerciais, pois os frutos produzidos pelas plantas hermafroditas apresentam características que agradam o consumidor.

A identificação do sexo das plantas só é feita na época do primeiro florescimento, que ocorre por volta de 4 meses após o plantio. Com isso, os produtores precisam triplicar o número de mudas no campo, para possibilitar a sexagem, com intuito de deixar apenas uma planta hermafrodita por cova. No entanto, esta estratégia aumenta a competição entre as plantas nas fases iniciais de seu desenvolvimento e eleva o custo de produção da cultura (ARANGO et al., 2008).

### **Recursos genéticos de *Carica papaya* L.**

O mamoeiro é uma planta tipicamente tropical, com seu centro de origem na Bacia Amazônica Superior, onde sua diversidade genética é máxima (BADILLO, 1993).

A família Caricaceae abrange 35 espécies distribuídas em seis gêneros, sendo *Carica* (1 espécie), *Horovitzia* (1 espécie), *Jacaratia* (7 espécies), *Jarilla* (3 espécies) e *Vasconcellea* (21 espécies) originários das Américas do Sul e Central, enquanto o gênero *Cylicomorpha* (2 espécies) pertence ao continente africano (VAN DROOGENBROECK et al., 2004).

De todas as espécies existentes na família Caricaceae, apenas *C. papaya* L. possui importância comercial significativa. Por outro lado, as espécies pertencentes ao gênero *Vasconcellea* são consideradas importantes repositórios de genes de interesse ao melhoramento do mamoeiro, principalmente em relação à resistência a doenças (DREW et al., 1998). O Equador é o principal centro de diversidade do gênero, onde estão cerca de 70% das espécies descritas de *Vasconcellea* (VAN DEN EYNDEN et al., 1999). Assim, a preservação, avaliação e caracterização desses recursos genéticos são essenciais para a sustentabilidade da cultura.

Mediante expedições de coletas realizadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), em parceria com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), em 1995 teve início a formação do Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG- Mamão) da Embrapa.

Atualmente, o maior BAG-Mamão do Brasil pertence à Embrapa Mandioca e Fruticultura e fica localizado em Cruz das Almas - BA. Possui quatro espécies (*Carica papaya*, *Vasconcellea cauliflora*, *Vasconcellea quercifolia* e *Jacaratia spinosa*), compreendidas em 104 acessos de *C. papaya*, 1 acesso de *V. cauliflora*, 1 acesso de *V. quercifolia* e 3 acessos de *J. spinosa*. A conservação dos acessos é feita sob condições de campo e por meio de armazenamento de sementes em câmara fria (10°C).

Para que os programas de melhoramento tenham material básico para o desenvolvimento de novas variedades, faz-se necessário conhecer a diversidade genética existente entre os acessos que compõem o banco de germoplasma (PEREIRA; PEREIRA, 2006). Com a caracterização dos acessos, pode-se quantificar a diversidade genética, analisar as relações genéticas existentes entre os genótipos, além de direcionar cruzamentos visando explorar a heterose encontrada, que contribuirá para a sustentabilidade da cultura do mamoeiro e preservação da variabilidade genética existente na família Caricaceae (DANTAS

et al., 1999). De posse de uma maior variabilidade genética surgem novas perspectivas para os trabalhos.

### **Ferramentas moleculares aplicadas a recursos genéticos e melhoramento do mamoeiro**

Todo programa de melhoramento de plantas tem como objetivo principal reunir em um genótipo as características desejáveis, de interesse comercial. Para tanto, é importante que se conheça o potencial do germoplasma disponível para uma melhor exploração da sua diversidade.

A identificação das características de interesse era, a princípio, realizada por meio de marcadores morfológicos baseados em caracteres fenotípicos. Porém, estes são facilmente influenciados pelo ambiente e tornam-se impraticáveis na análise de um grande número de plantas.

Com a evolução da genética molecular, surgiram os marcadores moleculares permitindo a identificação direta dos genótipos em nível de DNA, superando grande parte das limitações das análises fenotípicas (ALZATE-MARIN et al., 2005). Assim, os marcadores moleculares vêm ganhando espaço nos programas de melhoramento genético de mamoeiro e o seu uso pode auxiliar os métodos clássicos de melhoramento genético em diversos aspectos. Dentre as principais aplicações pode-se destacar a caracterização de variedades e acessos de germoplasma, estudos de diversidade genética (MÜHLEN et al., 2000), seleção assistida (ALZATI-MARIN et al., 2005) e construção de mapas (CHEN et al., 2007). Contudo, diversos tipos de marcadores podem ser utilizados para caracterização do banco de germoplasma de mamoeiro, permitindo quantificar a diversidade genética dos acessos e analisar as relações genéticas existentes entre os genótipos. O seu uso pode auxiliar os procedimentos clássicos de melhoramento genético, permitindo maior versatilidade e dinamismo aos métodos convencionais amplamente utilizados na cultura.

Stiles et al. (1993) realizaram um estudo com 11 marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) para avaliar relações genéticas existentes entre 10 cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.). Os resultados indentificaram polimorfismo suficiente para distinguir todas as variedades, indicando ser uma técnica prática, rápida e sensível para análise genômica. Porém, estes marcadores são considerados dominantes e possuem



como desvantagens o baixo conteúdo de informação genético por loco, a não discriminação entre genótipos homocigotos e heterocigotos e resultados ambíguos.

Estimativas detalhadas sobre as relações genéticas entre cultivares de *Carica papaya* L., linhagens oriundas de bancos de germoplasma não melhorado e seis outras espécies pertencentes ao gênero *Carica* foram obtidas com o uso de 186 marcadores do tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (KIM et al., 2002). Entretanto, além das desvantagens dos marcadores dominantes trata-se de uma técnica que envolve um número grande de etapas, necessitando de uma grande quantidade de reagentes e de um DNA de alto nível de pureza para garantir a digestão completa pelas enzimas de restrição (VOS et al., 1995).

Entre os diversos tipos de marcadores disponíveis, os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) merecem destaque, pois apresentam como vantagens a visualização de ambos os alelos de um indivíduo heterocigoto, elevado conteúdo de informação polimórfico, alta reprodutividade, rapidez e simplicidade da técnica, baixo custo de utilização e grande poder de resolução (OLIVEIRA et al., 2006).

Santos et al. (2003) utilizaram 32 marcadores microssatélites em 20 plantas hermafroditas e 20 femininas de diferentes cultivares de mamoeiro para analisar a eficiência da autofecundação e a frequência dos sexos nas progênes. Os resultados mostraram que grande parte das plantas hermafroditas, após autofecundação, produziram uma proporção de 2 plantas hermafroditas para 1 planta feminina e que problemas com a autopolinização, como a fixação incorreta e queda dos sacos de proteção dos botões florais, bem como a polinização cruzada com a ajuda de agentes polinizadores podem alterar essa proporção.

Ocampo Pérez et al. (2007) realizaram um estudo onde 15 marcadores do tipo microssatélites foram utilizados para analisar a diversidade genética existente entre 72 acessos de mamoeiro, distribuídos entre 13 regiões geográficas. Observou-se que os marcadores microssatélites são mais informativos quando comparado com outros marcadores de DNA utilizados em trabalhos com a cultura do mamoeiro e que não houve diferenciação entre os indivíduos selvagens e cultivados, confirmando a introgressão observada entre mamão silvestre e cultivado, já observada com descritores morfológicos e isoenzimáticos.

Marcadores microssatélites também foram utilizados por Chen et al. (2007) para construção de um mapa genético para o mamoeiro e por Oliveira et al. (2012) com objetivo de desenvolver novas linhagens de mamoeiros e categorizar as linhagens em grupos úteis com base nos perfis moleculares e características agronômicas.

Contudo, o mamoeiro ainda apresenta uma base genética estreita e as técnicas atualmente disponíveis são incapazes de gerar grandes informações moleculares. Diante dessa realidade, se faz necessário a utilização de diferentes tipos de marcadores moleculares, a exemplo de marcadores do tipo minissatélite, que apresentem alta capacidade de identificação de polimorfismos.

### **Marcadores Minissatélites**

Sequências repetitivas de DNA são abundantes no genoma dos eucariotos, exercendo importante influência na sua evolução (MAKALOWSKI, 2000). Podem estar dispersas no genoma como os elementos móveis, chamados transposons e retrotransposons ou organizadas em *tandem* como os satélites, os minissatélites e os microssatélites (COSTA; MARTINS, 2010).

Os microssatélites e os minissatélites são diferenciados pelo tamanho em pares de base, onde os microssatélites são formados por sequências de motivos curtos de 2-5 pb, segundo Chistiakov et al. (2006) e 1-6 pb, conforme Toth et al. (2000), enquanto minissatélites são feitos de motivos mais longos (6-100 nucleotídeos) (BARROS et al., 2008).

Os marcadores do tipo minissatélites são loco específico, codominantes e multialélicos, podendo ser utilizados em estudos de diversidade genética, análises filogenéticas e *fingerprinting* de variedades (OLIVEIRA et al., 2008). De acordo com Jeffreys et al. (1985), o polimorfismo encontrado neste marcador é baseado nas diferenças em número de sequências repetitivas e segundo Debrauwere et al. (1997) são instáveis devido a eventos de recombinação meiótica.

Existem poucos trabalhos envolvendo marcadores do tipo minissatélites disponíveis na literatura. Aqueles encontrados visam estudos evolutivos (SYKOROVA et al., 2006; HONMA et al., 2011), diversidade genética (CAVAGNARO et al., 2010), *fingerprinting* molecular (DENOEUDE et al., 2003), análise de expressão gênica (ESPLEY et al., 2009) e mapeamento genético (GUSTAFSON e YANO, 2000; ZAKRZEWSKI et al., 2010).

Com o sequenciamento do mamoeiro aliado ao uso da bioinformática é possível o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares, ainda limitadas para a cultura do mamoeiro, com maior cobertura do genoma, como é o caso dos minissatélites.

Esse tipo de marcador pode ser desenvolvido, de forma mais rápida e prática, a partir de pesquisas em base de dados e em outras abordagens *in silico*, como aquelas já realizadas para o desenvolvimento de marcadores microsatélites (GUPTA et al., 2010). O desenvolvimento de marcadores altamente informativos e codominantes como os minissatélites pode contribuir para a caracterização da variabilidade genética, cujas informações auxiliam nas respostas aos programas de melhoramento, aos principais problemas agrônômicos da cultura e na implementação da seleção assistida por marcadores.

## REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.333-342, 2005.
- ARANGO, L.V.; REZENDE, C.R.; CARVALHO, S.P. Identificação antecipada do sexo do mamoeiro pelos caracteres físicos das sementes e padrões isoenzimáticos das mudas. **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v.1, p.22-29, 2008.
- BADILLO, V.M. *Carica L. vs Vasconcella St.-Hil. (Caricaceae)* con la rehabilitacion de este último. **Ernstia**, v.10, p.74-79, 2000.
- BADILLO, V.M. *Caricaceae*. **Revista de la Facultad de Agronomía-Alcance**, v.43, 111p, 1993.
- BARROS, P.; BLANCO, M.G.; BOÁN, F.; GÓMEZ-MÁRQUEZ, J. Evolution of a complex minisatellite DNA sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, p.488-494, 2008.
- CAVAGNARO, P.F.; SENALIK, D.A.; YANG, L.; SIMON, P.W.; HARKINS, T.T.; KODIRA, C.D.; HUANG, S.; WENG, Y. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **BMC Genomics**, v.11, p.569, 2010.
- CHEN, C.; YU, Q.; HOU S.; LI, Y.J.; EUSTICE, M.; SKELTON, R.L.; VEATCH, O.; HERDES, R.E.; DIEBOLD, L.; SAW, J.; FENG, Y.; QIAN, W.; BYNUM, L.; WANG, L.; MOORE, P.H.; PAULL, R.E.; ALAM, M.; MING, R. Construction of a sequence-

tagged high-density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in Brassicales. **Genetics**, v.177, p.2481-2491, 2007.

CHISTIAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v.255, p.1-29, 2006.

COSTA, A.F.S.; PACOVA, B.E.V. **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória, ES: Incaper, 2003.

COSTA, A.M.; MARTINS, C. **Estrutura e Evolução dos Genomas**. Embrapa, Brasília DF, p.43-62, 2010.

DANTAS, J.L.L.; CASTRO NETO, M.T. Aspectos botânicos e fisiológicos. In: TRINDADE, A.V. (Org.). **Mamão, Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.11-14, 2000.

DANTAS, J.L.L.; LIMA, J.F. Seleção e recomendação de variedades de mamoeiro - Avaliação de linhagens e híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.617-621, 2001.

DANTAS, J.L.L.; OLIVEIRA, E.J. O melhoramento genético do mamoeiro: avanços, desafios e perspectivas. In: VIDAL NETO, F.C.; CAVALCANTI, J.J.V. (Ed.) **Melhoramento Genético de Plantas do Nordeste**. Brasília, DF: Embrapa, p.175-208, 2009.

DANTAS, J.L.L.; SOUZA, J.S.; PINTO, R.M.S.; LIMA, J.F. Variabilidade genética e melhoramento do mamoeiro. In: QUEIROZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R. R. (Org.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro** (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em 10 set. 2014.

DEBRAUWERE, H.; GENDREL, C.G.; LECHAT, S.; DUTREIX, M. Differences and similarities between various tandem repeat sequences: Minisatellites and microsatellites. **Biochimie**, v.79, p.577-586, 1997.

DENOEUDE, F.; VERGNAUD, G.; BENSON, G. Predicting human minisatellite polymorphism. **Genome Research**, v.13, p.856-867, 2003.

DREW, R.A.; O'BRIEN, C.M.; MAGDALITA, P.M. Development of interspecific *Carica* hybrids. **Acta Horticulture**, v.461, p.285-292, 1998.

ESPLEY, R.V.; BRENDOLISE, C.; CHAGNÉ, D.; KUTTY-AMMA, S.; GREEN, S.; VOLZ, R.; PUTTERILL, J.; SCHOUTEN, H.J.; GARDINER, S.E.; HELLENS, R.P.; ALLANA, A.C. Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. **The Plant Cell**, v.21, p.168-183, 2009.

FAO. **FaoStat: agriculture date**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 25 mai. 2013.

GUPTA, S.; SHUKLA, R.; ROY, S.; SEN, N.; SHARMA, A. *In silico* SSR and FDM analysis through EST sequences in *Ocimum basilicum*. **Plant Omics Journal**, v.3, p.121-128, 2010.

GUSTAFSON, J.P.; YANO, M. Genetic mapping of hypervariable minisatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.447-453, 2000.

HOFMEYR, J.D.J. Some genetic breeding aspects of *Carica papaya* L. **Agronomia Tropical**, v.17, p 345-351, 1967.

HONMA, Y.; YOSHIDA, Y.; TERACHI, T.; TORIYAMA, K.; MIKAMI, T.; KUBO, T. Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of *Oryza* and *Brassica*. **Current Genetics**, v.57, p.261-270, 2011.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 25 mai. 2013.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, E.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in Human DNA. **Nature**, v.314, p.67-73, 1985.

KIM, M.; MOORE, P.; ZEE, F.; FITCH, M.M.M.; STEIGER, D.; MANSCHARDT, R.; PAULL, R.; DREW, R.; SEKIOKA, T.; MING, R. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. **Genome**, v.45, p.503-512, 2002.

MAKAŁOWSKI, W. Genomic scrap yard: how genomes utilize all that junk. **Gene**, v.259, p.61-67, 2000.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Portaria 251/2011. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=825295627>>. Acesso em: 26 mai. 2011.

MEDINA, V.M.; CORDEIRO, Z.J.M. **Mamão para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI. 52p. 1994.

MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J.H.; SENIN, P.; WANG, W.; LY, B.V.; LEWIS, K.L.; SALZBERG, S.L.; FENG, L.; JONES, M.R.; SKELTON, R.L.; MURRAY, J.E.; CHEN, C.; QIAN, W.; SHEN, J.; DU, P.; EUSTICE, M.; TONG, E.; TANG, H.; LYONS, E.; PAULL, R.E.; MICHAEL, T.P.; WALL, K.; RICE, D.; ALBERT, H.; WANG, M.L.; ZHU, Y.J.; SCHATZ, M.; NAGARAJAN, N.; AGBAYANI, R.; GUAN, P.; BLAS, A.; WAI, C.M.; ACKERMAN, C.M.; REN, Y.; LIU, C.; WANG, J.; WANG, J.; NA, J.K.; SHAKIROV, E.V.; HAAS, B.; THIMMAPURAM, J.; NELSON, D.; WANG, X.; BOWERS, J.E.; GSCHWEND, A.R.; DELCHER, A.L.; SINGH, R.; SUZUKI, J.Y.; TRIPATHI, S.; NEUPANE, K.; WEI, H.; IRIKURA, B.; PAIDI, M.; JIANG, N.; ZHANG, W.; PRESTING, G.;

WINDSOR, A.; NAVAJAS-PÉREZ, R.; TORRES, M.J.; FELTUS, A. F.; PORTER, B.; LI, Y.; BURROUGHS, A.M.; LUO, M.C.; LIU, L.; CHRISTOPHER, D.A.; MOUNT, S.M.; MOORE, P.H.; SUGIMURA, T.; JIANG, J.; SCHULER, M.A.; FRIEDMAN, V.; MITCHELL-OLDS, T.; SHIPPEN, D.E.; DEPAMPHILIS, C.W.; PALMER, J.D.; FREELING, M.; PATERSON, A.H.; GONSALVES, D.; WANG, L.; ALAM, M. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). **Nature**, v.452, p.991-996, 2008.

MÜHLEN, G.S.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, v.57, p.319-328, 2000.

OCAMPO PÉREZ, J.; d'EECKENBRUGGE, G.C.; RISTERUCCI, A.M.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P. Papaya genetic diversity assessed with microsatellite markers in germplasm from the Caribbean region. **Acta Horticulturae**, v.740, p.93-101, 2007.

OLIVEIRA, E.J.; DANTAS, J.L.L.; CASTELLEN, M.S.; MACHADO, M.D. Identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio da exploração do banco de dados de DNA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.625-628, 2008.

OLIVEIRA, E.J.; OLIVEIRA, G.A.F.; COSTA, J.L.; OLIVEIRA, V.J.S.; DANTAS, A.C.V.L.; DANTAS, J.L.L.; PÁDUA, J.G. Genetic diversity and marker-assisted inbreeding in papaya. **Scientia Horticulturae**, v.147, p.20-28, 2012.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S. Marcadores moleculares no pré melhoramento de plantas. In: BORÉM, A.E.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV. p.85- 106, 2006.

RUGGIERO, C.; MARIN, S.L.D.; DURIGAN, J.F. Mamão, uma história de sucesso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume especial, p.76-82, 2011.

SANTOS, S.C.; RUGGIERO, C.; SILVA, C.L.S.P.; LEMOS, E.G.M. A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.263-267, 2003.

SOUZA, J.S. Comercialização, Aspectos Econômicos e Custos de Produção. In: DANTAS, J.L.L.; JUNGHANS, D.T.; LIMA, J.F. (Ed.) **Mamão: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.140-151, 2013.

STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M.B.; MANSHARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.697-701, 1993.

SYKOROVÁ, E.; FAJKUS, J.; MEZNÍKOVÁ, M.; LIM, K.Y.; NEPLECHOVÁ, K.; BLATTNER, F.R.; CHASE, M.W.; LEITCH, A.R. Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. **American Journal of Botany**, v.93, p.814-823, 2006.

TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p.967-981, 2000.

VAN DEN EYNDEN, V.; CUEVA, E.; CABRERA, O. **Plantas silvestres comestibles del sur del Ecuador**. Ediciones Abya-Yala, Quito, Ecuador, 1999.

VAN DROOGENBROECK, B.; KYNDT, T.; MAERTENS, I.; ROMEIJN-PEETERS, E.; SCHELDEMAN, X.; ROMERO-MOTOCHI, J.P.; VAN DAMME, P.; GOETGHEBEUR, P.; GHEYSEN, G. Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (*Caricaceae*) using PCR-RFLP. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.1473-1486, 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, 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.

ZAKRZEWSKI, F.; WENKE, T.; HOLTGRÄWE, D.; WEISSHAAR, B.; SCHMIDT, T. Analysis of a c0t-1 library enables the targeted identification of minisatellite and satellite families in *Beta vulgaris*. **BMC Plant Biology**, v.10, p.8, 2010.

# **CAPÍTULO 1**

## **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES MINISSATÉLITES PARA O MAMOEIRO**



## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES MINISSATÉLITES PARA O MAMOEIRO

**Resumo:** Enquanto marcadores microssatélites estão bem descritos, minissatélites são pouco explorados. Assim, este trabalho objetivou identificar, caracterizar e validar locos minissatélites para o mamoeiro (*Carica papaya* L.). O genoma do mamoeiro compreendendo 330 Mb foi utilizado para mineração de minissatélites com motivos variando de 6 a 500 pares de bases (pb), com no mínimo seis repetições, e em seguida 82 locos foram validados em um conjunto de 24 acessos. No total foram identificados 1.730 locos de minissatélites presentes em 695 sequências, com média de um minissatélite a cada 156 Kb. A variação do conteúdo GC foi de 0,00 a 83,84%, com média de 28,84%, indicando que os minissatélites do mamoeiro são ricos em AT. Motivos com até 20 bases representaram 71,5% dos marcadores. Além disso, a variação no número de repetições dos motivos foi de 6 a 186 repetições, com média de 9,27 repetições por minissatélite. Independentemente da classificação, a frequência dos minissatélites diminuiu com o aumento no número de unidades de repetição. Quarenta e nove por cento dos locos validados foram polimórficos, cujo número de alelos ( $N_A$ ) variou de 2 a 7, com média de 3,10. Os valores médios do conteúdo de informação polimórfica (PIC) heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) foram de 0,38, 0,43 e 0,11, respectivamente. Não foram observadas correlações significativas entre tamanho dos motivos, número de repetições e conteúdo GC dos minissatélites com os parâmetros de diversidade genética, a exemplo do  $N_A$ ,  $H_e$  e PIC. Este estudo demonstra claramente o polimorfismo e a potencialidade de uso dos minissatélites na detecção de variações genéticas intraespecíficas em *C. papaya*, úteis para fins de manejo dos recursos genéticos e melhoramento de plantas.

**Palavras chave:** *Carica papaya* L.; número variável de sequências repetidas (VNTR); marcador molecular; diversidade genética; melhoramento.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MINISATELLITES PRIMERS FOR PAPAYA

**Abstract:** While microsatellite markers are well described, there are few studies on minisatellite. This study aimed to identify, characterize and validate minisatellites loci for papaya (*Carica papaya* L.). The length of papaya genome comprising 330 Mb was used for mining minisatellites with motifs ranging 6-500 base pairs (bp), with at least six replicates and 82 loci were validated in a set of 24 accessions. 1730 minisatellites loci were identified in total, present in 695 sequences with an average of a minisatellite every 156 Kb. The variation of GC content was 0.00 to 83.84%, with an average of 28.84%, indicating that the papaya minisatellites are rich in AT. Motifs with up to 20 bases represented 71.5% of the markers. In addition, the variation on the number of motif's repetitions was 6-186 repetitions, with 9.27 mean repetitions per minisatellites. Regardless the classification, the minisatellite frequency decreased with the increase on the number of repeating units. Forty-nine percent of validated loci were polymorphic, the number of alleles (NA) ranged from 2 to 7, with a mean of 3.10. The average values of polymorphic information content (PIC), expected heterozygosity (He) and observed (Ho) were 0.38, 0.43 and 0.11, respectively. No significant correlations were observed among size of motifs, number of repetitions and GC content of minisatellites with genetic diversity parameters such as the NA, He and PIC. This study clearly demonstrates the polymorphism and the potential use of minisatellites in the detection of intraspecific genetic variations in *C. papaya*. The results are useful for handling purposes of genetic resources and plant breeding.

**Keywords:** *Carica papaya* L.; variable number of tandem repeats (VNTR); molecular marker; genetic diversity; breeding.

## INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma cultura de expressiva importância para o Brasil, por ser considerado um dos principais produtores mundiais da fruta, com produção de 1,85 milhão de toneladas em 2013 e participação com 16,09% do mercado mundial (FAO, 2013). O restrito número de variedades exploradas comercialmente no Brasil pertence aos grupos Solo e Formosa. A reduzida oferta de variedades de mamoeiro com desempenho agrônômico superior em relação a atributos produtivos, resistência a doenças e qualidade de frutos contribui para a baixa produtividade nacional que é de 49,0 t.ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2013) em comparação com o potencial produtivo da cultura, acima de 150 t.ha<sup>-1</sup> (SHIVAKUMAR et al., 2012).

Para o desenvolvimento de novas variedades de mamoeiro é preciso investir na caracterização e avaliação dos recursos genéticos da espécie, com intuito de introduzir variabilidade genética adicional nos plantios comerciais. A quantificação da diversidade e análise das relações genéticas entre acessos permite que o melhorista direcione os cruzamentos para maximização dos ganhos genéticos nas populações segregantes.

A variabilidade genética pode ser avaliada utilizando descritores morfo-agronômicos e dados moleculares. Descritores morfo-agronômicos são ferramentas úteis para uma avaliação preliminar do germoplasma, porque permitem uma visão rápida da diversidade disponível (RAGHU et al., 2007). Entretanto, embora com número limitado, apenas descritores qualitativos possuem herança simples e permitem inferências confiáveis sobre a variabilidade dos acessos. Por outro lado, descritores quantitativos são especialmente importantes na avaliação do potencial agrônômico do germoplasma. No entanto, este tipo de descritor mostra uma natureza genética complexa e sofre muita influência ambiental, tendo assim algumas restrições para estudos de diversidade. Em contraste, marcadores de DNA revelam diferenças genotípicas de forma mais

eficiente do que os descritores morfo-agronômicos, sobretudo por serem invariáveis a influências ambientais e não mudarem sua configuração durante o ciclo de desenvolvimento da planta (KIM et al., 2002; JESUS et al., 2013).

Diversos tipos de marcadores podem ser utilizados para caracterização do germoplasma de mamoeiro, permitindo quantificar a diversidade genética dos acessos e analisar as relações genéticas existentes. Estudos relacionados à análise de diversidade genética no mamoeiro foram realizados com uso de marcadores dominantes e codominantes, como os RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (STILES et al., 1993); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (KIM et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011); SSR (*Simple Sequence Repeats*) (OCAMPO PÉREZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; ASUDI et al., 2013; MATOS et al., 2013). De modo geral, marcadores codominantes possuem uma maior capacidade de revelar polimorfismos quando comparado a outros marcadores de DNA (OCAMPO PÉREZ et al., 2007). Contudo, o mamoeiro ainda apresenta uma base genética bastante estreita, que associada à baixa capacidade de geração de informações moleculares com as técnicas atualmente disponíveis, resulta na subutilização destas ferramentas genômicas na conservação e uso do germoplasma. Assim, é preciso investir esforços em diferentes tipos de marcadores moleculares que apresentem alta capacidade de geração de polimorfismos, a exemplo de marcadores minissatélites.

Minissatélites ou *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) são definidos como sequências repetidas em tandem (6 a 100 pares de bases - pb). O polimorfismo destes marcadores está relacionado a variações no número de fragmentos e na capacidade dos motivos de minissatélites hibridizar com diferentes locos com algum grau de similaridade ao longo do genoma (VERGNAUD; DENOEUDE, 2000). Isto torna os minissatélites uma poderosa ferramenta nas mais diversas análises genéticas. Apesar disso, inicialmente a detecção de locos de minissatélites era uma técnica pouco atrativa, em função de ser extremamente laboriosa por utilizar os mesmos princípios da técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), que envolve digestão do DNA por enzimas de restrição, transferência para membranas de nylon, hibridização com sondas e visualização por autorradiografia (JEFFREYS et al., 1985).

Vantagens inerentes à técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) era um atrativo para o desenvolvimento de soluções inovadoras para exploração do

polimorfismo dos minissatélites. Porém, considerando a necessidade de conhecimento das sequências dos minissatélites para a realização de ampliações específicas (loco-específico) via PCR e a indisponibilidade de sequências genômicas depositadas em bancos de dados, Heath et al. (1993) desenvolveram uma técnica denominada *Direct Amplification of Minisatellite-region DNA* (DAMD), que utiliza um único iniciador para amplificação dos locos de minissatélites. Isto foi possível porque cada loco minissatélite possui uma região curta, altamente conservada, conhecida como uma sequência núcleo (JEFFREYS et al., 1985), que pode ser utilizada como iniciador para a PCR. Esta metodologia tem sido utilizada em diversos grupos de peixes e aves (HEATH et al., 1993), amoreira (BHATTACHARYA et al., 2005) e espécies de *Salvia* (INCE; KARACA et al., 2012). Contudo, trata-se de uma técnica multiloco (marcador dominante), que possui como principal desvantagem a incapacidade de distinção dos indivíduos homocigóticos e heterocigóticos e obtenção direta das frequências de alelos em cada loco. Além disso, a natureza molecular do polimorfismo não é completa, pois mutações de ponto, deleções e inserções nos sítios de ligação dos iniciadores podem impedir sua ligação e amplificação do fragmento desejado. Por outro lado, o conhecimento do genoma da espécie permite o desenvolvimento de minissatélites loco-específico (codominantes), a exemplo dos resultados obtidos com espécies de *Oryza* e *Brassica* (HONMA et al., 2011) e em humanos (DENOEUDE et al., 2003). Além das vantagens inerentes dos marcadores codominantes, diferentemente dos marcadores microsatélites, cujos motivos variam de 2-5 pb segundo Chistiakov et al. (2006) e entre 1-6 pb conforme Toth et al. (2000), os motivos dos minissatélites são mais longos (> 6 bases - VERGNAUD; DENOEUDE, 2000) e com isso podem ser separados e visualizados por eletroforese em gel de agarose convencional (ECKERT et al., 2005; BALLY et al., 2010), dispensando equipamentos mais sofisticados de separação e visualização dos fragmentos.

Recentemente, com o sequenciamento do genoma do mamoeiro (MING et al., 2008) e a consequente disponibilidade de sequências de DNA nos mais diversos bancos de dados (NCBI e Phytozome), são ilimitadas as oportunidades para a identificação de novos marcadores moleculares pela estratégia de exploração desses bancos. Apesar das vantagens dos minissatélites e do avanço das pesquisas nas áreas de biologia molecular e genômica, marcadores

codominantes como os minissatélites têm sido pouco explorados para o desenvolvimento de estudos genéticos na cultura do mamoeiro (OLIVEIRA et al., 2008).

A mineração de dados tem sido rotineiramente utilizada para a identificação de sequências repetidas em tandem, a exemplo dos microssatélites (EUSTICE et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; CAVAGNARO et al., 2010; JAIN et al., 2014). De forma análoga, as sequências genômicas representam uma excelente alternativa para o desenho de um grande número de iniciadores minissatélites para a cultura do mamoeiro, a exemplo do que tem sido feito em humanos (DENOEUDE et al., 2003), fungos (JĘDRYCZKA et al., 2010) e outras plantas (BASTIEN et al., 2003; ZAKRZEWSKI et al., 2010; HONMA et al., 2011).

O desenvolvimento desses marcadores pode contribuir para aumentar o nível de detecção de polimorfismo molecular dentro e entre acessos de mamoeiro, sendo uma importante ferramenta para análises genéticas da espécie, que é caracterizada por possuir elevada endogamia e baixo nível de polimorfismo fenotípico e molecular. Portanto, este trabalho objetivou a identificação e caracterização de marcadores do tipo minissatélites via mineração do genoma, bem como a validação desses iniciadores em genótipos de mamoeiro para determinação da sua potencialidade para as mais diversas análises genéticas na espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Sequências genômicas**

O genoma da variedade 'SunUp', transgênica com resistência ao vírus da mancha-anelar do mamoeiro, sequenciada por Ming et al. (2008), foi utilizado para a mineração em busca de sequências de minissatélites. O genoma anotado está disponibilizado no *US Department of Energy's Joint Genome Institute* (USDOE JGI) no sitio <http://www.phytozome.net/papaya.php>. As sequências abrangem aproximadamente 330 Mb distribuídas em 5.809 contigs.

### **Detecção dos minissatélites e desenho dos iniciadores**

As sequências foram obtidas em formato FASTA e em seguida analisadas pelo programa *Tandem Repeats Finder* - TRF (BENSON, 1999) para localização

de sequências repetidas que caracterizam minissatélites, utilizando os seguintes parâmetros: peso 2, 5 e 7 para *match*, *mismatch* e *indels*, respectivamente; escore mínimo de alinhamento para detecção do minissatélite (30) e tamanho máximo do motivo (500). Foram analisados motivos de minissatélites com variação de 6 a 500 bases, com no mínimo seis repetições dos minissatélites e acima de 70% de coincidências na sequência.

Oitenta e dois minissatélites foram escolhidos aleatoriamente para desenho e validação em acessos de mamoeiro. Os iniciadores foram desenhados utilizando o *software* Primer 3 v.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), com a temperatura de anelamento variando de 50°C a 60°C, com diferença máxima de 3°C entre os pares de iniciadores, comprimento do iniciador (pb): 18- 22 bases, e conteúdo GC entre 40 e 60%. Para os demais parâmetros utilizou-se os valores padrão do programa.

### **Material genético**

Inicialmente foram utilizados dois genótipos de mamoeiro (Calimosa e Sunrise Solo) para otimização das melhores condições de reação e amplificação dos locos de minissatélites e em seguida 24 acessos pertencentes ao BAG-Mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para a caracterização do polimorfismo dos minissatélites (Tabela 1).

### **Extração e quantificação do DNA genômico**

Amostras de folhas jovens dos acessos utilizados no estudo foram coletadas, identificadas e armazenadas em ultra freezer a -80°C. O DNA dos acessos foi extraído utilizando o protocolo com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle & Doyle (1990), com pequenos ajustes.

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 (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), realizada em géis de agarose a 1,0% (p/v) e tampão de corrida TBE (0,89M Tris, pH 8,0; 0,89M ácido bórico; 0,02M EDTA), pH 8,1 na concentração de 0,5x. A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual das intensidades das bandas, reveladas pela coloração com brometo de etídeo (10 mg/ml<sup>-1</sup>). Posteriormente, o DNA de trabalho foi padronizado para 2,5 ng/μL<sup>-1</sup>.

**Tabela 1:** Origem e descrição dos acessos de mamoeiro utilizados na caracterização dos marcadores minissatélites.

<b>Acessos</b>	<b>Origem</b>	<b>Germoplasma</b>	<b>Tipo do fruto</b>	<b>Sistema reprodutivo</b>
CMF008	Malásia	Melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF011	Costa Rica	Não melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF017	Taiwan	Não melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF024	Costa Rica	Cultivar	Formosa	Ginodióico
CMF038	Brasil	Melhorado	Comum	Ginodióico
CMF054	Havaí	Não melhorado	Solo	Ginodióico
CMF068	Brasil	Melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF082	África do Sul	Melhorado	Solo	Ginodióico
CMF102	Brasil	Não melhorado	Comum	Ginodióico
CMF108	África do Sul	Melhorado	Comum	Ginodióico
CMF115	África do Sul	Melhorado	Comum	Ginodióico
CMF123	Tailândia	Cultivar	Formosa	Ginodióico
CMF125	Havaí	Melhorado	Comum	Ginodióico
CMF128	Brasil	Cultivar	Solo	Ginodióico
CMF129	Brasil	Não melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF134	Brasil	Não melhorado	Comum	Dióico
CMF135	Brasil	Não melhorado	Comum	Ginodióico
CMF138	Brasil	Melhorado	Solo	Ginodióico
CMF142	Brasil	Melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF143	Brasil	Melhorado	Solo	Ginodióico
CMF147	Brasil	Melhorado	Solo	Ginodióico
CMF157	Brasil	Não melhorado	Comum	Dióico
CMF165	Brasil	Não melhorado	Comum	Dióico
CMF189	Brasil	Não melhorado	Formosa	Dióico

### **Otimização e genotipagem dos iniciadores de minissatélites**

Para otimização dos locos de minissatélites, as reações de PCR foram realizadas utilizando dois genótipos de mamoeiro (Calimosa e Sunrise Solo) em volume final de 15  $\mu$ L, contendo 10 ng de DNA, 0,2 mM dos iniciadores, 0,2 mM de dNTPs e 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil), em diferentes temperaturas, concentrações de cloreto de magnésio e de tampão de PCR. As amplificações, em diferentes condições, foram conduzidas em termociclador Veriti® 96-Well (Applied Biosystems, Foster City CA, EUA), e seus produtos separados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) a 2% (peso/volume), corados com brometo de etídio (10mg/mL) e visualizados em luz UV.



Após a determinação das melhores condições de amplificação dos locos de minissatélites via PCR, foi realizada a genotipagem dos 24 acessos de germoplasma visando determinar o potencial de detecção de polimorfismo dos minissatélites. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1000 (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) a 3% (peso/volume), corados com brometo de etídio (10mg/mL), visualizados no equipamento Carestream Gel Logic 212 PRO (Kodak, Rochester NY, EUA) para posterior análise. O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil).

### **Análise dos dados**

A análise descritiva dos locos de minissatélites foi realizada com auxílio do programa PowerMarker v.3.25 (LIU; MUSE, 2005), estimando-se as medidas de variabilidade apresentadas como: 1) número de alelos por loco, 2) heterozigosidade observada ( $H_o$ ), 3) heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) calculada por:  $H_e = 1 - \sum p_{ij}^2$ , onde  $p_{ij}$  é a frequência do  $j$ th alelo para o  $i$ th loco, e 4) conteúdo de informação polimórfica (PIC), de acordo com Botstein et al. (1980), em que  $PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2$ , em que  $k$  é o número de alelos e  $p_i$  e  $p_j$  são as frequências dos alelos  $i$  e  $j$ , respectivamente.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

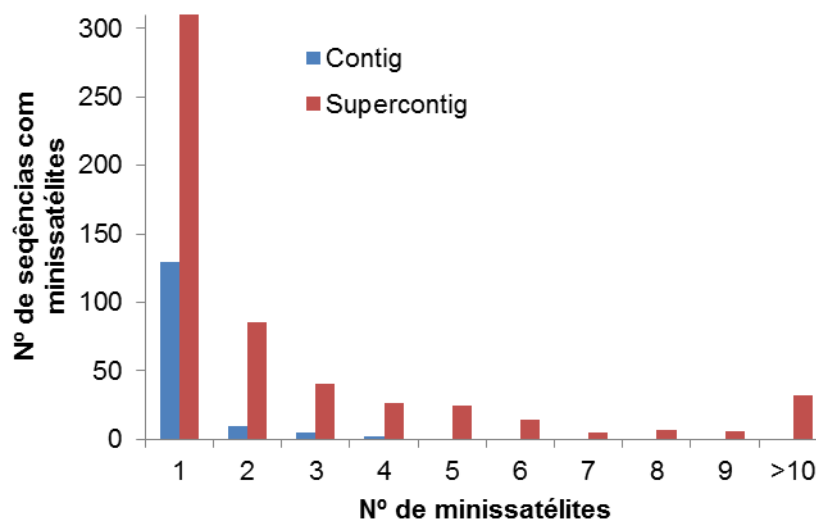
### **Identificação e caracterização dos locos minissatélites**

Por meio da análise de 5.809 contigs e supercontigs que abrangem cerca de 330 Mb (88% do genoma do mamoeiro) foram identificados 1.730 locos de minissatélites presentes em 146 contigs e 549 supercontigs. Os locos de minissatélites estão presentes em sequências que abrangem 271 Mb (72,8% de cobertura do genoma do mamoeiro, de acordo com Ming et al. 2008). Portanto, foi identificado, em média, um minissatélite a cada 156 Kb. Embora atualmente não se tenha relatos sobre o desenvolvimento de minissatélites na cultura do mamoeiro, é possível estabelecer algumas comparações com outras repetições em tandem, a exemplo do trabalho de Eustice et al. (2008), que analisaram 35,5

Mb do genoma do mamoeiro e identificaram um microssatélite a cada 37,8 Kb, além de Oliveira et al. (2008), que analisaram 44.591 sequências depositadas no banco de dados e identificaram um microssatélite a cada 5,65 kb. Diferenças na indicação das frequências destas repetições no genoma do mamoeiro podem ser devidas a variações nos parâmetros de pesquisa e os algoritmos utilizados na sua detecção, bem como as diferenças no tipo e tamanho dos conjuntos de dados utilizados. Em outras espécies, os microssatélites podem ser ainda mais frequentes. Em *Cucumis sativus* L., Cavagnaro et al. (2010) analisaram cerca de 55,3% do genoma e encontraram um microssatélite a cada 1,8 Kb. Pelo maior tamanho dos motivos e menor taxa de mutação, os minissatélites parecem estar mais espaçados no genoma do mamoeiro em comparação com os microssatélites.

Adicionalmente, alguns autores afirmam que a distribuição cromossômica de minissatélites humanos é altamente viesada para a região dos telômeros sendo, portanto, um bom marcador para detecção de microdeleções nas extremidades dos cromossomos, associada a patologias humanas (GIRAUDEAU et al., 2001). Por outro lado, em plantas, Zakrzewski et al. (2010) demonstraram que os minissatélites estão melhor distribuídos nos cromossomos de *Beta vulgaris*, considerando que estes locos foram fisicamente mapeados em todos os 18 cromossomos da espécie, embora os sítios de hibridização (técnica FISH - *fluorescent in situ hybridization*) demonstraram que há uma preferência de localização por regiões terminais e heterocromatina intersticial. Ainda de acordo com Zakrzewski et al. (2010), este padrão de localização cromossômica se assemelha com a distribuição de sequências microssatélites em cromossomas *B. vulgaris*. Por outro lado, embora os estudos de localização cromossômica dos minissatélites não tenham sido realizados, observou-se uma abrangência dos minissatélites em 72,8% do genoma do mamoeiro, indicando que estes minissatélites parecem estar bem distribuídos no genoma da espécie.

A maioria dos contigs (88,36%) e supercontigs (56,36%) apresentou apenas uma sequência de minissatélites. Apenas 17 contigs apresentaram mais de dois minissatélites, sendo observados quatro minissatélites em apenas dois contigs. Por outro lado, pela maior organização e tamanho das sequências, muitos supercontigs apresentaram mais de dois minissatélites, alguns (5,84%) chegando a apresentar mais de 10 minissatélites (Figura 1).



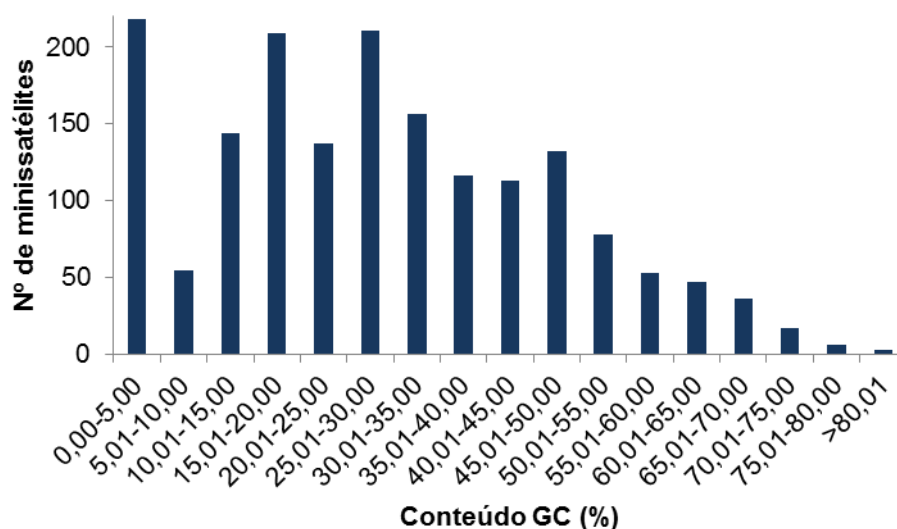
**Figura 1:** Distribuição das sequências de minissatélites nos diferentes contigs e supercontigs referentes a sequências de DNA do genoma de mamoeiro.

A conservação interna dos motivos utilizados como um preditor do polimorfismo em marcadores microsatélites não pode ser aplicada aos minissatélites, devido à maior complexidade dos seus processos de mutação (DENOEUDE et al., 2003). Portanto, considerando a dificuldade de classificação dos minissatélites em motivos específicos, a exemplo dos microsatélites, pelo próprio processo de mutação e geração de novos alelos, que promove uma grande interrupção dos locos de minissatélites, adotou-se o critério de conteúdo GC para classificação destes marcadores (Figura 2).

De modo geral, a variação no conteúdo GC foi de 0,00 a 83,84%, com média de 28,84%, indicando que os minissatélites são ricos em nucleotídeos A e T. Cerca de 86% dos minissatélites apresentam até 50% de conteúdo GC. O número de minissatélites com conteúdo de GC acima de 50% é bastante reduzido, sendo que apenas três locos possuem mais de 80% de GC nos motivos dos minissatélites (Figura 2). Estes resultados foram corroborados pelo estudo de Zakrzewski et al. (2010), ao promoverem a identificação e caracterização de sequências repetitivas no genoma de *Beta vulgaris*, na qual as nove famílias de minissatélites identificadas apresentaram conteúdo GC variando entre 24 e 33%.

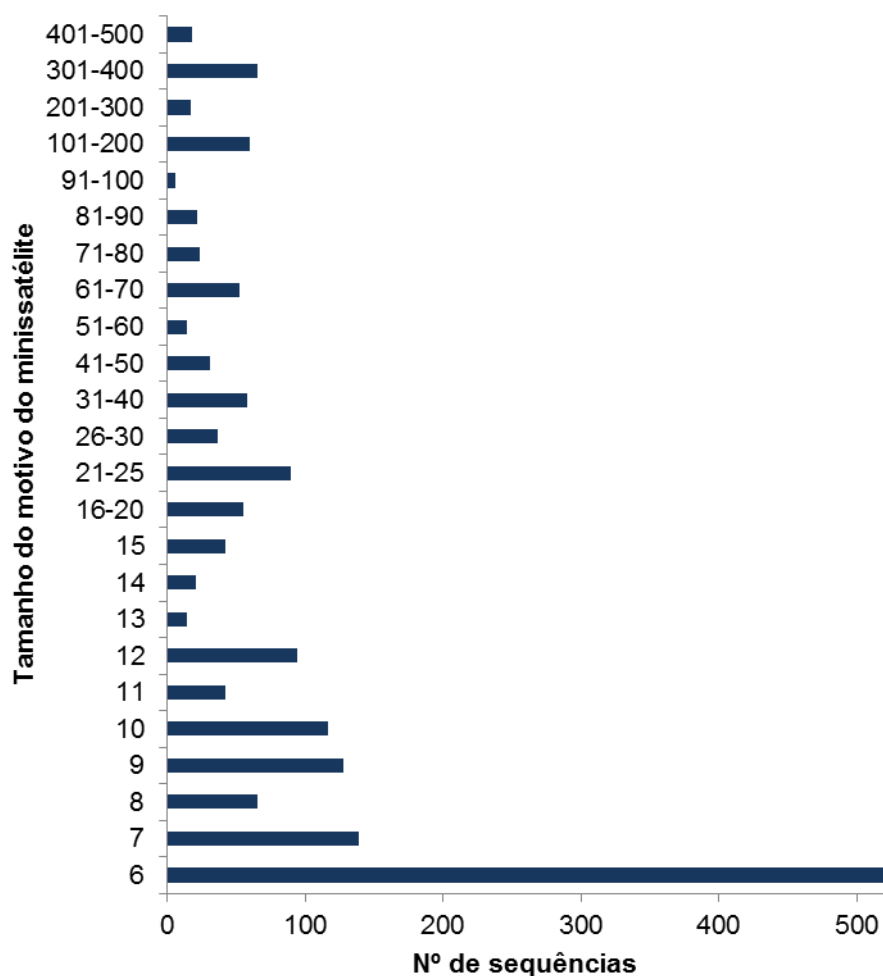
Ao analisarem 35,5 Mb (cerca de 9,5% do genoma do mamoeiro), Eustice et al. (2008) verificaram que independente do tamanho do motivo das sequências

repetitivas do tipo microssatélites, repetições ricas em AT foram predominantes. Como exemplo, repetições do tipo AT/TA representaram 69,2% dos dinucleotídeos, enquanto que repetições AAG/TTC e ATT/TTA representaram mais de 84% dos trinucleotídeos. Resultados semelhantes foram observados em outras espécies vegetais, nas quais a maioria dos microssatélites apresentou maior quantidade de bases A e T. De acordo com Cavagnaro et al. (2010), a densidade de dinucleotídeo AT em pepino foi cerca de 1.400 vezes maior que CG em regiões genômicas e 3,5 em regiões gênicas. Estas diferenças podem ser parcialmente explicadas pela composição relativa de nucleotídeos do genoma, uma vez que o mamoeiro possui cerca de 65% de AT (MING et al., 2008). Outra possível explicação para o baixo conteúdo GC nos locos de minissatélites refere-se à alteração da citosina por metilação, em sequências repetitivas. Neste caso, a desaminação converte 5-metilcitosina em timina, resultando em aumento do conteúdo AT (MONTERO et al., 1992).



**Figura 2:** Classificação dos motivos dos locos minissatélites identificados na análise do genoma do mamoeiro em função do conteúdo GC(%).

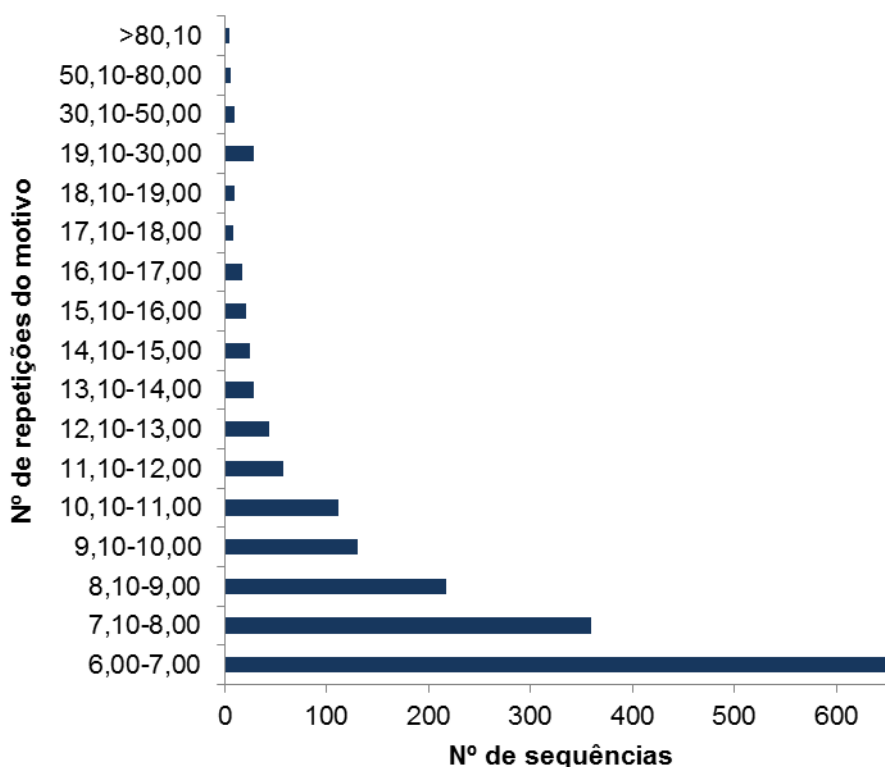
Com relação ao tamanho dos motivos de minissatélites, 30,0%, 8,0% e 3,8% dos marcadores foram classificados como hexa-, hepta- e octanucleotídeos, respectivamente (Figura 3). Motivos com até 10 bases representaram 56,0% dos minissatélites e 71,5% apresentaram até 20 bases a maioria dos locos. Motivos acima de 100 bases representaram apenas 9,6% dos minissatélites analisados.



**Figura 3:** Distribuição das sequências em função do tamanho do motivo dos minissatélites identificados na análise do genoma do mamoeiro.

De modo geral, a representação do tamanho dos motivos de repetições em tandem é bastante variável em função da espécie. Dos 84 minissatélites encontrados em espécies de *Brassica* e *Oryza*, a maioria apresentou motivos variando de 20 a 72 pb, sendo que 67 minissatélites tinham motivos entre 22 e 62 pb (HONMA et al., 2011).

Relativamente ao número de repetições do motivo dos minissatélites, a variação observada foi de 6 a 186 repetições, com média de 9,27 repetições dos motivos. Em termos relativos, 37,7% dos locos apresentaram entre 6,0 e 7,0 repetições do motivo, 20,7% entre 7,1 e 8,0 repetições e 12,5% entre 8,1 e 9,0. Portanto, motivos com até 9 repetições representaram mais de 70% dos minissatélites observados (Figura 4).



**Figura 4:** Distribuição das sequências em função do número de repetições do motivo dos minissatélites identificados na análise do genoma do mamoeiro.

Independentemente da classificação, a frequência dos minissatélites diminuiu com o aumento no número de unidades de repetição. Contudo, esta alteração foi mais gradual em motivos de menor tamanho (sobretudo em motivos de 6 e 7 nucleotídeos), onde foram observados os maiores números de repetições dos motivos. Observações semelhantes foram feitas em microsatélites em que o número de repetições de dinucleotídeos (9,6) foi quase duas vezes maior que número de unidades de repetição dos trinucleotídeos (4,9) e três vezes maior do que motivos de tetra- a octanucleotídeos (3,2 a 3,3) (CAVAGNARO et al., 2010). Em *Jatropha curcas* L., Jain et al. (2014) também observaram que o número dos microsatélites diminuiu com o aumento do tamanho do motivo, tendo em vista que mononucleotídeos foram mais abundantes (54%), seguido de dinucleotídeos (27%), trinucleotídeos (11%), tetra-, penta- e hexanucleotídeos (3%). De maneira geral, sequências com muitas repetições tendem a acumular mutações e eventos de recombinação que limitam a expansão criam trocas de bases que levam a imperfeições nos motivos e, conseqüentemente, descaracterizam o loco. Isto é

especialmente impactante para os locos de microssatélite, fazendo com que motivos com várias repetições sejam menos frequentes. Observações desta natureza foram realizadas por Eustice et al. (2008), ao identificarem que a maioria das repetições de microssatélites de mamoeiro (98,1%) foram inferiores a 40 pb.

### **Análise do polimorfismo dos minissatélites**

Dezesseis locos minissatélites (CPMini-05, CPMini-06, CPMini-11, CPMini-17, CPMini-18, CPMini-20, CPMini-23, CPMini-33, CPMini-34, CPMini-54, CPMini-67, CPMini-68, CPMini-73, CPMini-74, CPMini-81 e CPMini-84) não apresentaram nenhum produto de amplificação ou apresentaram um rastro no gel e por isso foram descartados das análises posteriores. Para os demais 66 locos minissatélites, as condições de reação de PCR foram ajustadas para amplificação de fragmentos específicos conforme o tamanho esperado, de acordo com o desenho dos iniciadores. O principal ajuste na reação de PCR foi em relação à concentração de  $MgCl_2$ , na qual 38 e 27 locos se ajustaram à concentração de 1,5mM e 2mM, respectivamente (Tabela 2). Com relação às condições de amplificação, os locos minissatélites se ajustaram a uma variação de 45°C a 64°C de temperatura de anelamento, embora a metade dos locos tenha apresentado bom padrão de amplificação com temperatura de anelamento variando de 58°C a 60°C.

**Tabela 2:** Descrição dos 82 marcadores minissatélites otimizados para avaliação do polimorfismo em acessos de mamoeiro, contendo informações sobre sua localização no genoma do mamoeiro (Contigs e Super contigs - SC), sequência dos iniciadores e motivos, número de repetições dos motivos, temperatura de anelamento dos iniciadores (TA), tamanho do alelo esperado e concentração de MgCl<sub>2</sub> utilizadas nas reações de PCR.

Primer	Localização	Iniciador 5' ( <i>forward</i> )	Iniciador 3' ( <i>reverse</i> )	Motivo	Nº repetições	TA	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Alelo (pb)
CPMini-01	SC-51	caacggaagtgctgccta	caaggcgtgatctgttga	taggggt	11,40	62,00	1,50	395
CPMini-03	SC-153	tgtgtcattgtggcattgg	ggtgaggagtcggcttcat	(agaaagag) <sub>5</sub> agaag (agaaaaa) <sub>4</sub>	11,50	50,00	1,50	653
CPMini-04	SC-30	gcagaaacagagccgaaat	agcagcctcatagctgaaa	aaacagaggctc	8,70	49,00	1,50	353
CPMini-05	SC-105	cagaaggtccatccaacacc	tccccacataggcaacaag	(tttaaat) <sub>3</sub> (aataaaa) <sub>5</sub>	7,50	-	-	459
CPMini-06	SC-2750	ctacttttctcggggaag	ctacttttctcggggaag	ctttcta	7,10	-	-	631
CPMini-07	SC-1847	gctcgcacgtcttcatctt	catggaggaggatgcaatta	ttaagcc	8,10	63,00	1,50	947
CPMini-08	SC-232	gccatgaaatccaaaagga	aagagaagagtcccgcaca	tcttgaa	16,10	58,00	1,50	284
CPMini-09	SC-957	ttgtgcgataccattcca	gccattttggcaagtgaag	atcactt	10,00	62,00	1,50	296
CPMini-10	SC-225	ggcgggttttgtgaaatta	gcccaaagccttgaatct	ttagggt	9,40	60,00	1,50	979
CPMini-11	SC-240	tgcatccaaagaaacatcca	ctcatccaacacttcgacatt	ataaaaaa	6,50	-	-	390
CPMini-12	SC-148	gcatgattggcatgtatgaa	ttccgccagaaaattagcc	attatta	7,60	58,00	1,50	914
CPMini-13	SC-127	caaagagtgctgattgg	ggccaagtgggagagattt	cctttcc	6,10	62,00	1,50	808
CPMini-14	SC-107	tttttaggaggcaaccctga	ccacacatgcagctctgt	agcctgc	6,00	60,00	1,50	695
CPMini-15	SC-95	gatccgggaggcttatgaa	tgcaaaaagttagcccaaa	atgtcacttcattaaaagtatcactttcac	5,90	60,00	1,50	475
CPMini-16	SC-91	tgcaaaaattcagccctctc	ctgtttgtgcccgtatt	gaaagaa	6,30	62,00	1,50	488
CPMini-17	SC-88	tggaattgggagaagctga	catggcaagtctccactctt	gatgaagaa	9,80	-	-	297
CPMini-18	SC-75	tttcaattcctgccatcca	gctctcttgctgctgt	tagtaaa	8,30	-	-	631
CPMini-19	SC-70	ttgcctagcctgaccaaga	ggggtgaaacaaacaatgg	atgagct	6,30	58,00	1,50	466
CPMini-20	SC-49	actgaaccggatggagatg	tgaaaatgagaaggggaaa	ttgggctt	7,00	-	-	479
CPMini-21	SC-26	ccgacttccatctgcttca	gttccactcccttggtgct	tatgaaatgtcacgcatt	6,20	61,00	1,50	423
CPMini-22	SC-14	aaaggctatggccaaaaa	gcaaaaatgcatgaaatga	gatttg	6,70	60,00	1,50	404
CPMini-23	SC-108	tgccgttgtctctttcag	cctttccgggtgctacaata	atcatac	6,70	-	-	552
CPMini-24	Contig_40208	ggccatcaggttttccttt	ctggcctactttgcacacct	aggcccaagccc	6,70	58,00	1,50	195
CPMini-25	Contig_32224	cttcgattgttgggtta	tttgggctctgacgaatta	atgatta	6,60	58,00	1,50	245
CPMini-26	SC-240	tcaaaatcccctgggttga	taaatccccaagccctaaa	aaataaaaata	9,40	62,00	1,50	449
CPMini-27	SC_1222	gatcagtggggatcgagaga	cgctgcgtcacttattgtg	tctttt	5,90	64,00	1,50	389
CPMini-28	SC-211	tatgccaaccctgtttctc	gaccgaaccacaatttctc	tttttc	6,00	58,00	1,50	291
CPMini-29	SC-141	tgcacacactcaatcacacg	gcctgttggaagtgaag	tcacttt	8,10	64,00	1,50	658
CPMini-30	SC-116	cgggttacacgtcatccag	ggcggagatggctagttt	aaataaa	7,30	56,00	1,50	467
CPMini-31	SC-113	cggaggaagccctaaaa	gattctccgcctttcgtt	agggag	6,70	58,00	1,50	299



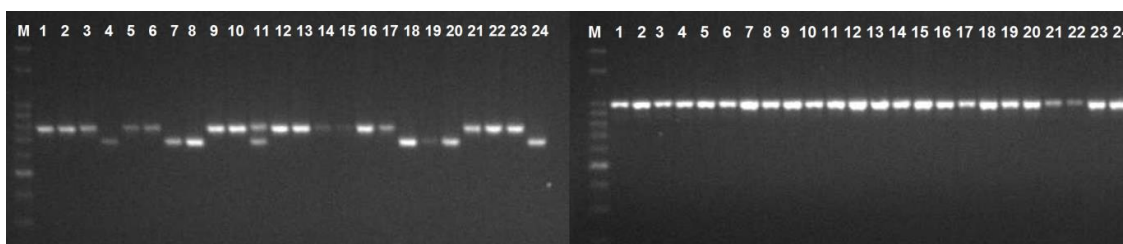
Tabela 2: Cont...

Primer	Localização	Iniciador 5' ( <i>forward</i> )	Iniciador 3' ( <i>reverse</i> )	Motivo	Nº repetições	TA	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Alelo (pb)
CPMini-32	SC-82	gcgtaagctcatccctcaa	ccccggtccacttgaatc	agaaaga	8,00	60,00	1,50	583
CPMini-33	SC-80	cggttgattttgtgatgc	tgccaaagaagatcatgcaa	ttttat	6,60	-	-	824
CPMini-34	SC-65	gattggtccgggagatta	ggtttggcatggggttatt	taagcat	8,00	-	-	870
CPMini-35	SC-62	caagcaatcggaagaagca	cgcccgactaaatgaact	aataatt	6,00	58,00	1,50	441
CPMini-36	SC-152	cagcattggtgcattaacct	agtggatgggtggttga	agaagg	6,80	58,00	1,50	410
CPMini-37	SC-34	catcgacgggagagacaga	tcaccatgcatcatataca	aagaaag	7,60	60,00	1,50	344
CPMini-38	SC-34	cagcccgtatgaacatcg	agcactcctttcccaaaa	tgataaa	6,10	60,00	1,50	499
CPMini-39	SC-32	gggagggagagagaacgag	gcgctccttgaacctgag	gggagag	8,30	58,00	1,50	300
CPMini-40	SC-23	tccttactcccctattct	gaaaagagagaccgggagaa	cctattt	6,40	58,00	1,50	396
CPMini-41	SC-22	cgagtcaggggtaaaaaact	ggccctgtgtttgttga	aaaaata	7,40	58,00	1,50	395
CPMini-42	SC-14	ccttgatcatgatttaggg	tgataaaaggcctcattttc	gtttagggttagagttaatg	6,30	55,00	1,50	717
CPMini-43	SC-14	ccaaccagggtcaaataaa	tgtggagagagatggtggtg	ctctcaa	6,00	61,00	1,50	655
CPMini-44	SC-8	gcacattttatggggagga	gtctctgacacgaacccaaa	aaataaa	6,30	58,00	1,50	384
CPMini-45	SC-7	ggaaccttccaccgagat	taacggcgtgctgtgtg	ctccctc	6,60	58,00	1,50	388
CPMini-46	SC-7	cacatgtaaaaccgtagg	ctaattctgacggcaaatga	ttttat	6,60	58,00	1,50	343
CPMini-47	SC-5	tatgggtcccgaatcgt	ccactacgatgatcccaga	ctcactc	6,10	58,00	1,50	383
CPMini-48	SC-2	ttctcaggtagccagcaa	gggcagcagcaataaagaa	tcttctc	6,40	58,00	1,50	350
CPMini-49	SC-1913	aagctgaccaggcatccta	ggagtcacgagatccatgc	aaaattaa	42,70	63,00	2,00	323
CPMini-51	SC-1686	ccatcatccacactactgacc	atgaaagtgggtgctgcttc	cacacacacactctgatcattctctcccgt caccagcatcggcgaccattaaccacctct cgacctataaccaggc	7,00	63,00	1,50	599
CPMini-52	Contig_27935	agaatgagtgggggcaat	ggcgacctctgtcacct	gtgtgtgtagtggcctggtataggtcgtgag atggctaacggctgcggatggtggtgacgg gagagaatgatcaga	6,20	60,00	2,00	471
CPMini-53	SC-198	ccaaaaacgttactgtgaaa	aggaccaccgcctaattc	ataac	6,50	60,00	2,00	174
CPMini-54	SC-152	gccgaattcaggtccatta	ggcctccaatgatcctta	cccattacagg	32,40	-	-	495
CPMini-55	SC-152	aacatgatcacatgctgacc	ggctggtgggggttagag	tcactcagccacacacaccaactac aacaactc	6,50	63,00	2,00	289
CPMini-56	SC-77	ccgtgacaccaatagta	ggccattgtggacacatc	tttttctt	14,00	62,00	2,00	250
CPMini-57	SC-122	cagcgaccaacatcata	ctgctgggaaagaaggaag	tttttttc	10,20	60,00	2,00	180
CPMini-58	SC-77	catattggagtattatgaca	tgaacatccccactgat	ttttttctttttct	11,00	55,00	2,00	295
CPMini-59	SC-74	cgaggactgacttttcttc	ggcctgtgctgattgattg	tatcatatcatttcatctaaagtatcacttt ctctataatgattgtacgatgcttctctattacta	9,70	62,00	2,00	371
CPMini-60	SC-15	ttgggatccccttctacc	catttggcactactggaacg	agtagtctgctgactagtgaat	10,60	63,00	2,00	818
CPMini-61	SC-0	atttgctgccacacttc	acgggcaagagaagga	tttttcttctct	11,40	60,00	2,00	204

Tabela 2: Cont...

Primer	Localização	Iniciador 5' ( <i>forward</i> )	Iniciador 3' ( <i>reverse</i> )	Motivo	Nº repetições	TA	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Alelo (pb)
CPMini-62	SC-42	gaatcatggtcgggtagaga	agtggcctttccctctca	aaaaagaagaagaagaagaaaa	6,70	62,00	2,00	246
CPMini-63	SC-117	cccattgggtgtttggt	agcctttgtgctgttgc	gtgagcttgggtggcgaggcgagcccattgg	8,70	55,00	2,00	353
CPMini-64	SC-0	cttcgtgcgaaggctcagt	caagcgggtgactcaataaa	ctctataatgattcgtactatgcttctttattacta agtatgctgctgtactagtgaat	9,70	62,00	2,00	745
CPMini-65	SC-5	caccagatgtgtgctgac	ccaggggtcaaagaccat	tctctgtc	10,60	63,00	2,00	164
CPMini-66	SC-5	aatgtggcgcacatttg	agagttgccggaaggag	cttcttttttt	10,20	60,00	2,00	241
CPMini-67	SC-163	tctcaggcccagatattaca	caatcgcgctataattgctt	aactgttagtataataatatatata gtggcctattacgggtcgagggataggcggtt attggtgctgctgatactggtgacaggtgaga	12,00	-	-	523
CPMini-68	SC-5	ctcgacgagaaggggtt	gcccctcgagctctat	atggaatctgtgtgtgtg	8,70	-	-	837
CPMini-69	SC-10	tccaactttgttctga	ggccaaaaaccctattcg	gagagaggagaga	6,40	45,00	2,00	242
CPMini-70	SC-22	ggcttcgcacagaggta	agagcgcattattcaaca	ctctatgatgattgtatgatggttcttctgttactg agtatgctgctgattagtgaat	10,70	64,00	2,00	830
CPMini-71	SC-22	cagcttcgtgtaaggta	tggatatggcaccctca	atgattcttctattactaagtatggtgctgacta gttgaatctataatgattgtacg	8,80	62,00	2,00	678
CPMini-72	SC-24	atgcatgccttcccttt	tctttgtcccacatctctc	gagagagaagcta	6,50	50,00	2,00	206
CPMini-73	SC-16	tttgaatgaatgatgacg	agccattttgtttgcatt	atgtattatataattaatatata	9,00	-	-	559
CPMini-74	SC-24	acggtactgtatgtaagtgt	agccactgtatcttctttg	aatatacagatataatataataaataat attatataatgataataat	6,70	-	-	676
CPMini-75	SC-50	ccaacagcccctttaca	tgggagcctatggagaca	ctctctcctctctctatataatattttatt cttacccaacaaccctctatagactcccatttt	6,30	62,00	2,00	468
CPMini-76	SC-23	caaaaataaattatgggtgt	agagaaaacgaggggaga	tctctcttctt	12,60	55,00	2,00	200
CPMini-77	SC-23	ccaccctcttaaaaattca	gtttggtaaaatagattgga	tataataataata	6,30	58,00	2,00	394
CPMini-78	SC-127	gatgagggggcgtgtgt	cccataatacaccggcagt	tgtggccaaggggaagggcgggtgtgtgtgtggc agggtactgccgataag	6,60	60,00	2,00	400
CPMini-79	SC-168	atgagcgtaccagcaac	cggcgaaggagagagaaa	tctttctcttcttctc	7,00	60,00	2,00	225
CPMini-80	SC-110	acacaagactcatcaacatgg	caccgacattagggctcg	taataatataatataaaactgttagtg	12,60	60,00	2,00	579
CPMini-81	SC-13	aatcataaaactacggaacca	tgcgtaaaagttcttacct	aataataatataataaataatgataataat atatataaaactgtt	10,50	-	-	838
CPMini-82	SC-47	gggttgccattactcgtg	tttgacatgcatcccta	agagaaagagagag	6,40	50,00	2,00	210
CPMini-83	SC-2	tttaattctctgccaaca	tgacaactgttttatttga	tatatataatataatataatatttataatataatg tata	6,60	50,00	2,00	591
CPMini-84	SC-38	cttgggggaagagagacg	accatccgtcacctatcg	gtgtgtgtgagtgccctggtataggctgtagat ggctaacggctgccgatggtggtgacggggag agaatgacaga	6,20	-	-	484

Os 66 locos de minissatélites foram utilizados para análise do polimorfismo em um conjunto de 24 acessos de mamoeiro, dos quais 26 foram monomórficos (CPMini-12, CPMini-13, CPMini-26, CPMini-29, CPMini-32, CPMini-35, CPMini-38, CPMini-41, CPMini-42, CPMini-45, CPMini-51, CPMini-52, CPMini-53, CPMini-55, CPMini-57, CPMini-58, CPMini-59, CPMini-60, CPMini-61, CPMini-66, CPMini-70, CPMini-71, CPMini-77, CPMini-78, CPMini-79 e CPMini-80) e por isso foram excluídos das análises. Um exemplo da amplificação de locos polimórficos e monomórficos é apresentado na Figura 5. A taxa de locos minissatélites polimórficos no mamoeiro (49%) é comparável ao observado por outros autores na validação de marcadores microsatélites em pepino (48,3% - CAVAGNARO et al., 2010), e mamoeiro (52,9% - EUSTICE et al., 2008 e 59,0% - OLIVEIRA et al., 2010), porém menor que os 75% de locos minissatélites polimórficos em humanos (DENOEUDE et al., 2003).



**Figura 5:** Locos minissatélites amplificados a) CPMini-27 e b) CPMini-28 utilizados na análise de acessos de mamoeiro (amostras 1 a 24). M: marcador de peso molecular Ladder 50 pb.

Os demais 40 locos minissatélites polimórficos são apresentados na Tabela 3. Para os minissatélites polimórficos, o número de alelos variou de 2 a 7, em que os locos com maior número de alelos foram CPMini-16 (7 alelos), CPMini-04 (6 alelos) e os locos CPMini-21 e CP-Mini-46 (5 alelos). O número médio de alelos minissatélites foi 3,10. Em *Leptosphaeria maculans* L. sete minissatélites polimórficos possibilitaram a identificação de uma média de 5,0 alelos por loco (JĘDRYCZKA et al., 2010). Como não existem minissatélites desenvolvidos para o mamoeiro, comparações com microsatélites revelam maior número de alelos por loco, a exemplo dos trabalhos de Oliveira et al. (2010), onde foram identificados 4,02 alelos por loco na análise de 30 acessos e 18 variedades de mamoeiro, com 59 marcadores; Ocampo Pérez et al. (2007), que relataram uma

média de 6,6 alelos por loco de microssatélite ao avaliarem 72 acessos de mamoeiro; e Matos et al. (2013) que ao avaliarem um conjunto amplo de acessos de mamoeiro (96), identificaram 3 a 10 alelos, com média de 4,53 alelos por loco.

**Tabela 3:** Número de alelos por loco ( $N_A$ ), número de genótipos ( $N_G$ ), variação do tamanho em pares de base (pb), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) referente à caracterização de locos minissatélites em acessos de mamoeiro.

Loco	$N_A$	$N_G$	Varição (pb)	$H_e$	$H_o$	PIC
CPMini-01	4	6	340-400	0,56	0,25	0,49
CPMini-03	2	1	350-650	0,50	1,00	0,38
CPMini-04	6	8	330-500	0,75	0,29	0,71
CPMini-07	2	2	950-960	0,31	0,00	0,26
CPMini-08	3	3	290-310	0,34	0,08	0,31
CPMini-09	3	3	285-300	0,16	0,08	0,15
CPMini-10	3	3	960-975	0,67	0,00	0,59
CPMini-14	3	3	745-755	0,32	0,00	0,29
CPMini-15	4	5	480-500	0,46	0,13	0,42
CPMini-16	7	8	130-170	0,76	0,25	0,73
CPMini-19	2	2	450-460	0,41	0,00	0,32
CPMini-21	5	9	350-420	0,68	0,38	0,62
CPMini-22	2	2	400-410	0,04	0,04	0,04
CPMini-24	2	3	160-180	0,49	0,04	0,37
CPMini-25	2	2	220-230	0,28	0,00	0,24
CPMini-27	3	4	330-390	0,48	0,17	0,40
CPMini-28	3	3	280-310	0,19	0,13	0,18
CPMini-30	3	3	450-475	0,35	0,00	0,32
CPMini-31	3	3	285-305	0,35	0,17	0,32
CPMini-36	2	2	390-400	0,49	0,00	0,37
CPMini-37	4	6	345-370	0,66	0,33	0,60
CPMini-39	3	5	280-300	0,62	0,25	0,54
CPMini-40	3	4	390-410	0,49	0,13	0,43
CPMini-43	2	2	780-790	0,26	0,00	0,22
CPMini-44	3	3	380-390	0,60	0,00	0,53
CPMini-46	5	5	320-355	0,42	0,04	0,39
CPMini-47	3	4	400-420	0,66	0,41	0,58
CPMini-48	4	6	320-350	0,65	0,13	0,58
CPMini-49	2	2	310-320	0,22	0,00	0,19
CPMini-56	2	2	250-265	0,08	0,00	0,08
CPMini-62	3	3	240-260	0,45	0,00	0,41
CPMini-63	2	2	440-450	0,16	0,00	0,15
CPMini-64	3	3	820-850	0,23	0,00	0,21
CPMini-65	2	3	170-190	0,38	0,17	0,30
CPMini-69	3	3	220-240	0,30	0,00	0,27
CPMini-72	2	2	200-210	0,09	0,00	0,08
CPMini-75	2	2	460-470	0,35	0,00	0,29
CPMini-76	4	5	170-185	0,74	0,04	0,69
CPMini-82	4	5	200-220	0,53	0,04	0,47
CPMini-83	4	5	200-220	0,53	0,04	0,47
Média	3,10	3,68	-	0,42	0,11	0,38

O menor número de alelos de minissatélites em comparação com os microsatélites pode estar relacionado ao reduzido número de genótipos avaliados, à baixa variabilidade genética inerente a estes acessos, ou mesmo devido ao processo natural de formação dos minissatélites, que conduz a uma reduzida geração de novos alelos de minissatélites em comparação com os microsatélites (VIGOUROUX et al., 2002; ELLEGREN, 2004). De fato, de acordo com Denoeud et al. (2003), a instabilidade dos minissatélites surge por meio de eventos de conversão gênica durante a meiose, envolvendo troca entre alelos de cromátides irmãs e não-irmãs, sobretudo em regiões *hotspot*. Ainda segundo os autores, esses eventos resultam da reparação das duplas fitas quebradas durante a conversão gênica, que em muitas situações são resultado da recombinação de sequências de minissatélites com sequências *hotspot* aleatórias.

Diversos estudos têm demonstrado a baixa variação molecular dentro da espécie *C. papaya*, a exemplo dos marcadores RAPD (STILES et al., 1993), AFLP (KIM et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011) e microsatélites (OLIVEIRA et al., 2010). Resultados semelhantes têm sido observados em outras espécies de reprodução mista, a exemplo do algodoeiro, onde foram identificados 2,13 alelos por marcador microsatélite e PIC médio de 0,40, por meio da análise de 53 variedades (BERTINI et al., 2006). Isso tem incentivado os esforços para o desenvolvimento de novos marcadores que sejam mais polimórficos ou que permitam a automação da genotipagem com alta acurácia na análise molecular. Dentre estes novos marcadores moleculares os minissatélites tem enorme potencial para se tornarem ferramentas genômicas de referência, pois o menor número de alelos por loco minissatélite pode ser vantajoso para o estabelecimento de sistemas e genotipagem multiplex, uma vez que menores variações no tamanho dos alelos permitem o uso de maior número do mesmo espectro de detecção de fluorescência (FARIA et al., 2011). Locos com motivos de maior tamanho têm sido utilizados em análises refinadas que necessitam de alta acurácia, a exemplo de identidade genética e paternidade em humanos (RUITBERG et al., 2001).

O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 130 a 975 pb, conforme esperado em função do desenho dos iniciadores. Os valores de PIC variaram de 0,04 (CPMini-22) a 0,73 (CPMini-16), com média de 0,38. De acordo com a classificação apresentada por Botstein et al. (1980), os valores de PIC podem ser

agrupados em três níveis: altamente informativo ( $PIC > 0,5$ ); moderadamente informativo ( $PIC$  entre 0,25 e 0,5) e pouco informativo ( $PIC < 0,25$ ). Assim, 25%, 50% e 25% dos marcadores minissatélites podem ser considerados altamente, moderadamente e pouco informativos, respectivamente. O PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do loco, levando em consideração o número de alelos identificados, como também as frequências relativas desses alelos. Sendo assim, em média os valores de PIC dos minissatélites podem ser considerados moderadamente informativos (0,38).

As estimativas de  $H_e$  variaram bastante entre os locos, com intervalo de 0,04 (CPMini-22) a 0,76 (CPMini-16), com média de 0,43, enquanto que a  $H_o$  variou de 0,00 (CPMini-56, CPMini-72, CPMini-63, CPMini-49, CPMini-64, CPMini-43, CPMini-25, CPMini-69, CPMini-07, CPMini-14, CPMini-30, CPMini-75, CPMini-19, CPMini-62, CPMini-36, CPMini-44 e CPMini-10) a 1,00 (CPMini-03), com média de 0,11 (Tabela 3). A ampla variação nos valores de  $H_o$  e  $H_e$  resulta da amplitude no número de alelos por loco e da distribuição das frequências alélicas. Os valores de  $H_o = 0,0$  nos dezessete locos minissatélites podem ser explicados pelo baixo número de alelos nestes locos (2 a 3 alelos), bem como pelo seu estado homocigótico.

Utilizando 81 marcadores microssatélites na análise de 30 acessos de germoplasma e 18 variedades locais de mamoeiro, Oliveira et al. (2010) identificaram variação em  $H_o$  de 0,0 a 0,85 e  $H_e$  de 0,08 a 0,82, com média de 0,19 e 0,59, respectivamente. As menores estimativas de  $H_o$  e  $H_e$  dos minissatélites em comparação com locos microssatélites podem ser característica do tipo de marcador, população utilizada ou mesmo número e representação dos acessos utilizados na validação dos marcadores.

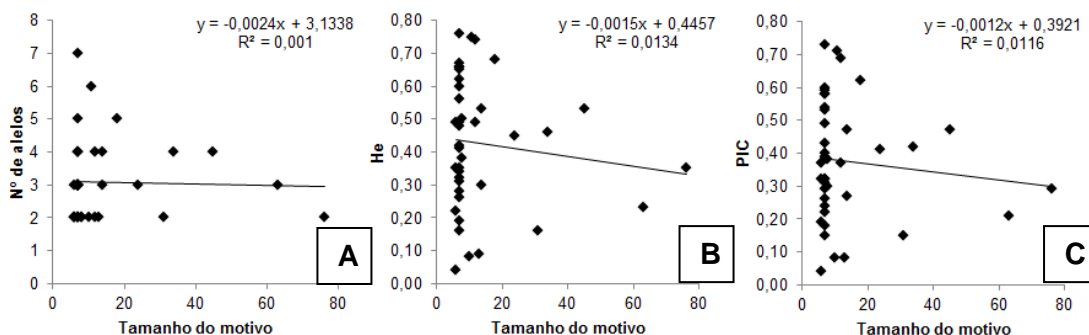
De acordo com Honma et al. (2011), minissatélites ocorreram predominantemente em regiões não funcionais em DNA mitocondrial de angiospermas, e seu número pode ser insuficiente para o uso como marcadores informativos em plantas porque são pouco polimórficos, apresentam muitos alelos nulos e ao mesmo tempo baixo número de alelos por loco. Contudo, minissatélites nucleares, a exemplo dos identificados no presente trabalho, demonstraram sua capacidade de detecção de polimorfismo, mesmo em um conjunto reduzido de acessos e, portanto, foram informativos o suficiente para análises genéticas

relacionados à conservação e manejo de germoplasma, bem como para o melhoramento do mamoeiro.

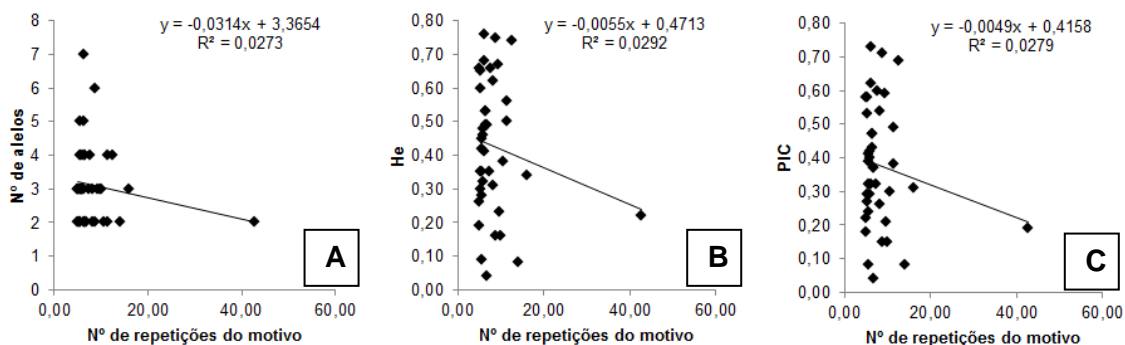
### Relação entre algumas características dos minissatélites e polimorfismo

Não foram observadas correlações lineares significativas entre tamanho dos motivos (Figura 6), número de repetições dos motivos (Figura 7) e conteúdo GC (%) dos minissatélites (Figura 8) com os parâmetros de diversidade genética, a exemplo do número de alelos por loco, He e PIC.

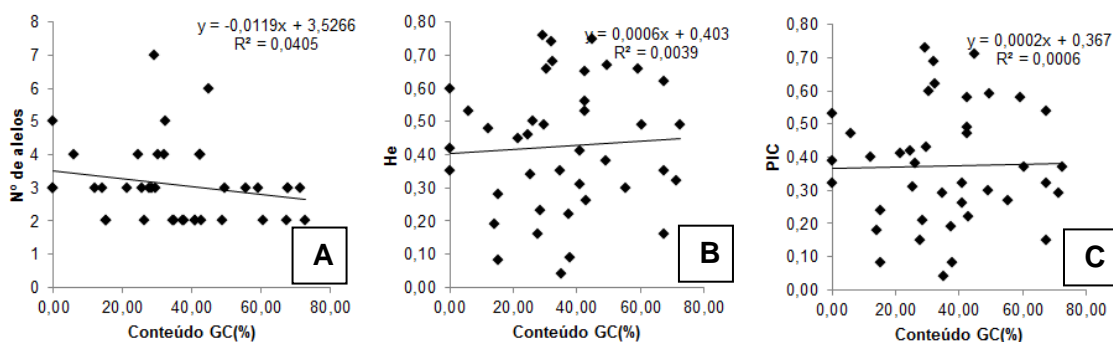
Em relação ao tamanho do motivo dos minissatélites, observou-se que motivos altamente contrastantes, a exemplo de 6 bases (CPMini-22, CPMini-49, CPMini-31, CPMini-36) apresentaram variação no número de alelos (2 a 3), He (0,0 a 0,49) e PIC (0,04 a 0,37) ligeiramente inferiores a locos com mais de 30 bases (CPMini-63, CPMini-15, CPMini-83, CPMini-64, CPMini-75), cuja variação dos parâmetros de diversidade genética foi: número de alelos (2 a 4), He (0,16 a 0,53) e PIC (0,15 a 0,47) (Figura 6).



**Figura 6:** Relação entre tamanho dos motivos dos minissatélites e parâmetros de diversidade genética. A) número de alelos por loco; B) heterozigosidade esperada (He) e C) conteúdo de informação polimórfica dos locos de minissatélites.



**Figura 7:** Relação entre número de repetições do motivo dos minissatélites e parâmetros de diversidade genética. A) número de alelos por loco; B) heterozigosidade esperada (He); e C) conteúdo de informação polimórfica dos locos de minissatélites.



**Figura 8:** Relação entre conteúdo GC (%) e parâmetros de diversidade genética. A) número de alelos por loco; B) heterozigosidade esperada (He); e C) conteúdo de informação polimórfica dos locos de minissatélites.

Outra associação comum na literatura refere-se a um maior número de repetições dos motivos de microssatélites *versus* polimorfismo, com embasamento teórico de que o escorregamento da polimerase durante a replicação do DNA é mais frequente em locos com maior número de repetições, o que poderia acumular maior número de alelos na população. Este tipo de associação tem sido feito em milho em que o número de repetições foi um bom indicador do nível de variabilidade (VIGOUROUX et al., 2002). Contudo, isto não foi observado na análise de minissatélites de mamoeiro, onde associações entre número de repetições dos motivos *versus* número de alelos, He e PIC apresentaram correlações não significativas ( $R^2=0,0273$ ,  $0,0292$  e  $0,0279$ , respectivamente) (Figura 7). Outros trabalhos também demonstraram a baixa associação entre diferentes motivos, tipos, números e comprimentos de locos



microssatélites em espécies de *Fusarium* versus polimorfismo molecular (MAHFOOZ et al., 2012).

Um exemplo da falta de associação entre polimorfismo e conteúdo GC pode ser claramente observada nos locos CPMini-44 e CPMini-39, cujos conteúdos de GC foram de 0,00 e 67,68%, respectivamente, porém os parâmetros He (0,60 x 0,62) e PIC (0,53 x 0,54) foram muito próximos para ambos marcadores. A falta de associação entre polimorfismo e conteúdo GC, observada nos locos de minissatélites do mamoeiro, está em desacordo com as observações de Vergnaud e Denoeud (2000) em humanos, onde a maioria dos minissatélites clássicos (polimórfico e/ou hipervariáveis) é considerada rica em GC, com forte assimetria entre o conteúdo de purinas e pirimidinas. Porém, outros trabalhos demonstraram que minissatélites ricos em AT também podem ser hipervariáveis (YAMAUCHI et al., 2000). Além disso, de acordo com Le Fleche et al. (2001) o conteúdo GC parece não estar associada com o polimorfismo de minissatélites em bactérias. Portanto, esta associação pode não ser universal, sobretudo pelo fato do conteúdo GC variar significativamente entre genomas.

Diante destas observações, a escolha de locos de minissatélites para análises genéticas do mamoeiro deve levar em consideração os parâmetros de diversidade genética (número de alelos,  $H_o$  e PIC), independente das características dos marcadores em termos de números de repetição, tamanho e composição dos motivos.

## **CONCLUSÕES**

Este estudo expõe claramente o polimorfismo e a potencialidade de uso dos marcadores minissatélites na detecção de variações genéticas intraespecíficas em diferentes acessos de *C. papaya*.

Também revela a possibilidade de desenvolvimento de 1.730 iniciadores de minissatélites distribuídos no genoma do mamoeiro (cobertura de 72,8% do genoma), cuja disponibilidade pode facilitar a construção de mapas genéticos de alta resolução, que são fundamentais para aplicações como clonagem posicional de genes, mapeamento comparativo e associativo, além do uso na seleção genômica para acelerar o desenvolvimento de novas cultivares de mamoeiro.

## REFERÊNCIAS

- ASUDI, G.O.; OMBWARA, F.K.; RIMBERIA, F.K.; NYENDE, A.B.; ATEKA, E.M.; WAMOCHO, L.S. Evaluating diversity among kenyan papaya germplasm using simple sequence repeat markers. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v.13, p.7307-7324, 2013.
- BALLY, P.; GRANDAUBERT, J.; ROUXEL, T.; BALESSENT, M.H. FONZIE: An optimized pipeline for minisatellite marker discovery and primer design from large sequence data sets. **BMC Research Notes**, n.3, 2010.
- BASTIEN, D.; FAVRE, J.M.; COLLIGNON, A.M.; SPERISEN, C.; JEANDROZ, S. Characterization of a mosaic minisatellite locus in the mitochondrial DNA of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. **Theoretical and Applied Genetics**, v.107, p.574-580, 2003.
- BENSON, G. Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.573-580, 1999.
- BERTINI, C.H.C.M.; SCHUSTER, I.; SEDIYAMA, T.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization and genetic diversity analysis of cotton cultivars using Microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.321-329, 2006.
- BHATTACHARYA, E.; DANDIN, S.B.; RANADE, S.A. Single primer amplification reaction methods reveal exotic and indigenous mulberry varieties are similarly diverse. **Journal of Bioscience**, v.30, p.669-677, 2005.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- CAVAGNARO, P.F.; SENALIK, D.A.; YANG, L.; SIMON, P.W.; HARKINS, T.T.; KODIRA, C.D.; HUANG, S.; WENG, Y. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **BMC Genomics**, v.11, p.569, 2010.
- CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v.255, p.1-29, 2006.
- DENOEUDE, F.; VERGNAUD, G.; BENSON, G. Predicting human minisatellite polymorphism. **Genome Research**, v.13, p.856-867, 2003.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- ECKERT, M.; GOUT, L.; ROUXEL, T.; BLAISE, F.; JEDRYCZKA, M.; FITT B.; BALESSENT, M.H. Identification and characterization of polymorphic minisatellites

in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. **Current Genetics**, v.47, p.37-48, 2005.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.435-445, 2004.

EUSTICE, M.; YU, Q.; LAI, C.W.; HOU, S.; THIMMAPURAM, J.; LIU, L.; ALAM, M.; MOORE, P.H.; PRESTING, G.G.; MING R. Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya. **Tree Genetics & Genomes**, v.4, p.333-341, 2008.

FAO. **FaoStat: agriculture date**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 25 mai. 2013.

FARIA, D.A.; MAMANI, E.M.C.; PAPPAS JR., G.J.; GRATTAPAGLIA, D. Genotyping systems for *Eucalyptus* based on tetra-, penta-, and hexanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests. **Tree Genetics & Genomes**, v.7, p.63-77. 2011.

GIRAUDEAU, F.; TAINE, L.; BIANCALANA, V.; DELOBEL, B.; JOURNAL, H.; MISSIRIAN, C.; LACOMBE, D.; BONNEAU, D.; PARENT, P.; AUBERT, D.; HAUCK, Y.; CROQUETTE, M.F.; TOUTAIN, A.; MATTEI, M.G.; LOISEAU, H.A.; DAVID, A.; VERGNAUD, G. Use of a set of highly polymorphic minisatellite probes for the identification of cryptic 1p36.3 deletions in a large collection of patients with idiopathic mental retardation: Three new cases. **Journal of Medical Genetics**, v.38, p.121-125, 2001.

HEATH, D.D.; LWAMA, G.K.; DEVLIN, R.H. PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.5782-5785, 1993.

HONMA, Y.; YOSHIDA, Y.; TERACHI, T.; TORIYAMA, K.; MIKAMI, T.; KUBO, T. Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of *Oryza* and *Brassica*. **Current Genetics**, v.57, p.261-270, 2011.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 25 mai. 2013.

INCE, A.G.; KARACA, M. Species-specific touch-down DAMD-PCR markers for *Salvia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, p.1590-1595, 2012.

JAIN, N.; PATIL, G.B.; BHARGAVA, P.; NADGAUDA, R.S. *In Silico* mining of EST-SSRs in *Jatropha curcas* L. towards assessing genetic polymorphism and marker development for selection of high oil yielding clones. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p.1521-1541, 2014.

JĘDRYCZKA, M.; IRZYKOWSKI, W.; JAJOR, E.; KORBAS, M. Polymorphism of ten new minisatellite markers in subpopulations of phytopathogenic fungus

*Leptosphaeria maculans* differing with metconazole treatment. **Journal of Plant Protection Research**, v.50, p.103-109, 2010.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, E.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in Human DNA. **Nature**, v.314, p.67-73, 1985.

JESUS, O.N.; FREITAS, J.P.X.; DANTAS, J.L.L.; OLIVEIRA, E.J. Use of morpho-agronomic traits and DNA profiling for classification of genetic diversity in papaya. **Genetics and Molecular Research**, v.12, p.6646-6663, 2013.

KIM, M.; MOORE, P.; ZEE, F.; FITCH, M.M.M.; STEIGER, D.; MANSHARDT, R.; PAULL, R.; DREW, R.; SEKIOKA, T.; MING, R. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. **Genome**, v.45, p.503-512, 2002.

LE FLECHE, P.; HAUCK, Y.; ONTENIENTE, L.; PRIEUR, A.; DENOEUDE, F.; RAMISSE, V.; SYLVESTRE, P.; BENSON, G.; RAMISSE, F.; VERGNAUD, G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. **BMC Microbiology**, v.1, p.2, 2001.

LIU, K.; MUSE, S.V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, v.21, p.2128-2129, 2005.

MAHFOOZ, S.; MAURYA, D.K.; SRIVASTAVA, A.L.; KUMAR, S.; ARORA, D.K. A comparative in silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in coding regions of three formae speciales of *Fusarium oxysporum* and development of EST-SSR markers for polymorphism studies. **FEMS Microbiology Letters**, v.328, p.54-60, 2012.

MATOS, E.L.S.; OLIVEIRA, E.J.; JESUS, O.N.; DANTAS, J.L.L. Microsatellite markers of genetic diversity and population structure of *Carica papaya*. **Annals of Applied Biology**, v.163, p.298-310, 2013.

MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J.H.; SENIN, P.; WANG, W.; LY, B.V.; LEWIS, K.L.; SALZBERG, S.L.; FENG, L.; JONES, M.R.; SKELTON, R.L.; MURRAY, J.E.; CHEN, C.; QIAN, W.; SHEN, J.; DU, P.; EUSTICE, M.; TONG, E.; TANG, H.; LYONS, E.; PAULL, R.E.; MICHAEL, T.P.; WALL, K.; RICE, D.; ALBERT, H.; WANG, M.L.; ZHU, Y.J.; SCHATZ, M.; NAGARAJAN, N.; AGBAYANI, R.; GUAN, P.; BLAS, A.; WAI, C.M.; ACKERMAN, C.M.; REN, Y.; LIU, C.; WANG, J.; WANG, J.; NA, J.K.; SHAKIROV, E.V.; HAAS, B.; THIMMAPURAM, J.; NELSON, D.; WANG, X.; BOWERS, J.E.; GSCHWEND, A.R.; DELCHER, A.L.; SINGH, R.; SUZUKI, J.Y.; TRIPATHI, S.; NEUPANE, K.; WEI, H.; IRIKURA, B.; PAIDI, M.; JIANG, N.; ZHANG, W.; PRESTING, G.; WINDSOR, A.; NAVAJAS-PÉREZ, R.; TORRES, M.J.; FELTUS, A.F.; PORTER, B.; LI, Y.; BURROUGHS, A.M.; LUO, M.C.; LIU, L.; CHRISTOPHER, D.A.; MOUNT, S.M.; MOORE, P.H.; SUGIMURA, T.; JIANG, J.; SCHULER, M.A.; FRIEDMAN, V.; MITCHELL-OLDS, T.; SHIPPEN, D.E.; DEPAMPHILIS, C.W.; PALMER, J.D.; FREELING, M.; PATERSON, A.H.; GONSALVES, D.; WANG, L.; ALAM, M. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). **Nature**, v.452, p.991-996, 2008.

MONTERO, L.M.; FILIPSKI, J.; GIL, P.; CAPEL, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; SALINAS, J. The distribution of 5-methylcytosine in the nuclear genome of plants. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3207-3210, 1992.

OCAMPO PÉREZ, J.; d'EECKENBRUGGE, G.C.; RISTERUCCI, A.M.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P. Papaya genetic diversity assessed with microsatellite markers in germplasm from the Caribbean region. **Acta Horticulturae**, v.740, p.93-101, 2007.

OLIVEIRA, E.J.; AMORIM, V.B.O.; MATOS, E.L.S.; COSTA, J.L.; CASTELLEN, M.S.; PÁDUA, J.G.; DANTAS, J.L.L. Polymorphism of microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.28, p.519- 530, 2010.

OLIVEIRA, E.J.; COSTA, J.L.; SANTOS, L.F.; CARVALHO, F.M.; SILVA, A.S.; DANTAS, J.L.L. Molecular characterization of papaya genotypes using AFLP markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.848-858, 2011.

OLIVEIRA, E. J.; DANTAS, J. L. L.; CASTELLEN, M. S.; MACHADO, M. D. Identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio da exploração do banco de dados de DNA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.625-628, 2008.

RAGHU, D.; SENTHIL, N.; SARASWATHI, T.; RAVEENDRAN, M.; GNANAM, R.; WNKATACHALAM, R.; SHANMUGASSUNDARAM, P.; MOHAN, C. Morphological and simple sequence repeats (SSR) based fingerprinting of South Indian cassava germplasm. **International Journal of Integrative Biology**, v.1, p.141-148, 2007.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p.365-386. 2000.

RUITBERG, C.M.; REEDER, D.J.; BUTLER, J.M. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.320-322, 2001.

SHIVAKUMAR, B.S.; DHARMATTI, P.R.; CHANNAL, H.T. Effect of organic cultivation of papaya on yield, economics and soil nutrient status. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v.25, p.488-492, 2012.

STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M.B.; MANSARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.697-701, 1993.

TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p.967-981, 2000.

VERGNAUD, G.; DENOEUDE, F. Minisatellites: mutability and genome architecture. **Genome Research**, v.10, p.899-907, 2000.

VIGOUROUX, Y.; JAQUETH, J.S.; MATSUOKA, Y.; SMITH, O.S.; BEAVIS, W.D.; SMITH, J.S.C. AND DOEBLEY, J. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. **Molecular Biology and Evolution**, v.19, p.1251- 1260, 2002.

YAMAUCHI, M.; TSUJI, S.; MITA, K.; SAITO, T.; MORIMYO, M. A novel minisatellite repeat expansion identified at FRA16B in a Japanese carrier. **Genes & Genetic Systems**, v.75, p.149-154, 2000.

ZAKRZEWSKI, F.; WENKE, T.; HOLTGRÄWE, D.; WEISSHAAR, B.; SCHMIDT, T. Analysis of a c0t-1 library enables the targeted identification of minisatellite and satellite families in *Beta vulgaris*. **BMC Plant Biology**, v.10, p.8, 2010.

## **CAPÍTULO 2**

### **INFORMATIVIDADE DE MARCADORES MINISSATÉLITES E MICROSSATÉLITES PARA ANÁLISES GENÉTICAS NA CULTURA DO MAMOEIRO**

## INFORMATIVIDADE DE MARCADORES MINISSATÉLITES E MICROSSATÉLITES PARA ANÁLISES GENÉTICAS NA CULTURA DO MAMOEIRO

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a informatividade de marcadores minissatélites e microssatélites no mamoeiro (*Carica papaya* L.). Quarenta minissatélites e 91 microssatélites foram utilizados na genotipagem de 24 acessos de mamoeiro. As estimativas de diversidade genética, vínculo genético e análise de estrutura populacional foram comparadas. Foi observado menor número médio de alelos/loco nos minissatélites (3,10) em comparação com os microssatélites (3,57), embora os minissatélites tenham apresentado mais alelos raros (18,54%) em relação aos microssatélites (13,85%). Maiores heterozigosidade esperada ( $H_e=0,52$ ) e observada ( $H_o=0,16$ ) foram verificadas nos microssatélites em comparação com os minissatélites ( $H_e=0,42$  e  $H_o=0,11$ ), possivelmente em função do hermafroditismo da maioria dos acessos, que resulta em altos índices de autofecundação. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) e diversidade de Shannon-Wiener também foram maiores para os microssatélites (0,47 a 1,10, respectivamente) em comparação com os minissatélites (0,38 e 0,85, respectivamente). A probabilidade de exclusão de paternidade foi elevada para ambos os marcadores ( $>0,999$ ), e a probabilidade combinada de identidade foi de  $1,65^{-13}$  e  $4,33^{-38}$  para os mini e microssatélites, respectivamente. Isto indica que ambos os tipos de marcadores são ideais para análises de vínculo genético. A análise Bayesiana indicou a formação de dois agrupamentos ( $K=2$ ) para os dois marcadores, embora os minissatélites tenham indicado uma subestrutura ( $K=4$ ). Maior número de acessos com baixa probabilidade de atribuição a grupos específicos foi observado nos microssatélites. Coletivamente, os resultados indicaram maior informatividade dos microssatélites. Contudo, o menor poder informativo dos minissatélites pode ser compensado pelo uso de maior número de locos. Além disso, os minissatélites estão sujeitos a um menor erro na genotipagem pelo maior poder de detecção dos sistemas de genotipagem quando são utilizados motivos de maior tamanho.

**Palavras chave:** *Carica papaya* L., polimorfismo, marcadores moleculares, recursos genéticos, melhoramento.



## INFORMATIVENESS OF MINISATELLITE AND MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC ANALYSIS IN PAPAYA

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the information of minisatellite and microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). Forty minisatellites and ninety one microsatellites were used for genotyping twenty four papaya access. Estimates on genetic diversity, genetic link and analysis of population structure were compared. Less average number of alleles / locus minisatellite was observed in (3.10) compared to microsatellite (3.57), although the minisatellites have shown rarer alleles (18.54%) compared to microsatellite (13.85%). Larger expected heterozygosity ( $H_e = 0.52$ ) and observed ( $H_o = 0.16$ ) was observed in the microsatellites compared with minisatellites ( $H_e=0.42$  and  $H_o= 0.11$ ), possibly due to the most hermaphroditism accessions, resulting in high rates of self-fertilization. The polymorphic information content (PIC) and Shannon-Wiener diversity, were also higher for microsatellites (from 0.47 to 1.10, respectively) compared to minisatellite (0.38 and 0.85, respectively). The paternity exclusion probability was high for both markers ( $> 0.999$ ), and the combined probability of identity was from  $1.65^{-13}$  to  $4.33^{-38}$  for mini and microsatellites, respectively. It indicates that both types of markers are ideal for genetic link analysis. The Bayesian analysis indicated the formation of two groupings ( $K=2$ ) for both markers, although minisatellites have indicated a substructure ( $K=4$ ). Larger number of accessions with low assignment probability to specific groups was observed in microsatellites. Collectively, the results indicated higher informativeness of microsatellite. However, the less informative power of minisatellites may be offset by the use of larger number of loci. Furthermore, minisatellites are subject to a less error in the genotyping because there is greater power to detect genotyping systems when larger motifs are used.

**Keywords:** *Carica papaya* L., polymorphism, molecular markers, genetic resources, breeding.

## INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é a única espécie do gênero *Carica* pertencente à família Caricaceae (BADILLO, 1993, 2000). De todas as espécies relacionadas aos seis gêneros da família, o mamoeiro é a mais conhecida, sobretudo pela sua importância econômica. Embora haja divergências, a origem do mamoeiro tem sido atribuída à América Tropical (Garrett, 1995), porém, de acordo com alguns autores a espécie *C. papaya* tem sua origem nas terras baixas do leste da América Central, México ao Panamá (NAKASONE e PAULL, 1998).

Os frutos são gerados por polinização cruzada, autopolinização ou partenocarpia, que é dependente do sistema de reprodução do germoplasma. Muitos genótipos melhorados e alguns não melhorados são tipicamente ginodióicos, compostos de plantas femininas e hermafroditas. Por outro lado, muitos acessos não melhorados são dióicos (plantas masculinas e femininas), enquanto outros são trióicos (plantas masculinas, femininas e hermafroditas) (FITCH, 2005; MATOS et al., 2013). A ocorrência de polinização cruzada é um dos principais fatores responsáveis pela manutenção da diversidade da espécie e de altos níveis de heterozigosidade (OLIVEIRA et al., 2010b).

Tipicamente, as principais variedades de mamoeiro utilizadas comercialmente são ginodióicas, sendo que as plantas femininas são desbastadas deixando apenas as hermafroditas, que produzem frutos com formato, peso, espessura e cor de polpa mais desejada pelos consumidores. De modo geral, no Brasil o mamoeiro é classificado em dois grupos conhecidos como Solo e Formosa. Geralmente, os frutos do grupo Solo possuem formato de pera, com peso variando de 300 a 700 g, polpa de cor amarelo-alaranjado a avermelhada, dependendo da cultivar. Por outro lado, o grupo Formosa possui

formato alongado, com peso variando de 1.200 a 2.000 g e polpa de cor laranja a avermelhada (MATOS et al., 2013).

Dentre os problemas enfrentados pela cultura do mamoeiro tem-se a estreita base genética da espécie, sobretudo nas variedades comerciais, decorrente do hermafroditismo predominante em genótipos dos grupos Solo e Formosa, que resulta em mais de 95% de autofecundação. Diante dos relatos de variabilidade genética suficiente para a geração de novas variedades (OCAMPO et al., 2006; DIAS et al., 2011), faz-se necessário ampliar a base genética do mamoeiro mediante o uso de acessos de germoplasma. Contudo, previamente é preciso direcionar esforços de pesquisa nos estudos de caracterização e avaliação dos recursos genéticos existentes.

A identificação de características de interesse com base em descritores fenotípicos é de suma importância para valoração dos recursos genéticos do mamoeiro. Neste aspecto, Ocampo et al. (2006) avaliaram uma coleção de germoplasma do Caribe com base em descritores morfológicos e demonstraram que os acessos da Venezuela exibiram maior diversidade morfológica, enquanto os de Barbados foram distinguidos pela melhor qualidade do fruto. Esta diferenciação populacional, associada com a alta diversidade fenotípica pode ser útil para introgressão de características de interesse. Também com base em descritores fenotípicos, Dias et al (2011), avaliaram 27 acessos de mamoeiro entre cultivares, variedades melhoradas e variedades locais e demonstraram ampla variabilidade, com a maior parte da variação fenotípica em razão da variância genotípica. Os autores indicaram que as diferenças agrônômicas observadas eram suficientes para uso dos genótipos “per se” ou como parentais em programas de melhoramento.

De modo geral, características fenotípicas pouco influenciadas pelo ambiente (qualitativas) são de fácil avaliação e de elevada acurácia na obtenção de estimativas da variabilidade genética. Por outro lado, características fenotípicas fortemente influenciadas pelo ambiente (quantitativas) reduzem a acurácia na estimação da variabilidade genética. Para este tipo de dado, é preciso que sejam analisados dados históricos da cultura em diferentes anos e locais de avaliação, o que pode ser impraticável dependendo dos recursos financeiros e humanos disponíveis, bem como do número de acessos presentes na coleção de germoplasma.

Com a evolução da genética, o desenvolvimento de diversos tipos de marcadores moleculares permitiu a identificação de polimorfismo diretamente em nível de DNA, superando grande parte das limitações das análises fenotípicas (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Marcadores moleculares vêm sendo utilizados para a discriminação de acessos provenientes de bancos ou coleções de germoplasma, para a identificação de duplicatas e para prospecção da variabilidade genética intrínseca ou entre acessos de uma mesma espécie, uma vez que apresentam ampla capacidade de amostragem do genoma (STILES et al., 1993; KIM et al., 2002; MATOS et al., 2013).

Atualmente os esforços têm sido direcionados na descoberta das relações existentes entre os genótipos moleculares e características agrônômicas que podem facilitar a manutenção e o desenvolvimento de germoplasma com foco no desenvolvimento de variedades melhoradas. Diversos tipos de marcadores tem sido utilizados na caracterização do banco de germoplasma de mamoeiro, a exemplo do trabalho de Stiles et al. (1993), que utilizaram 11 marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) para avaliar as relações genéticas entre 10 cultivares de mamoeiro. Outros trabalhos de mesma natureza foram desenvolvidos por Kim et al. (2002) e Oliveira et al. (2011), ao estimarem a diversidade e avaliarem as relações genéticas entre acessos de mamoeiro com base em marcadores do tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Entretanto, marcadores RAPD e AFLP são considerados dominantes e possuem como desvantagens o baixo conteúdo de informação genética por loco e sua não discriminação genotípica, além da baixa reprodutibilidade (especialmente RAPD), grande número de etapas e exigência de DNA de alta qualidade (AFLP).

Por outro lado, marcadores moleculares codominantes, a exemplo dos microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), apresentam como vantagens a visualização de ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto, elevado conteúdo de informação polimórfico, alta reprodutibilidade, rapidez e simplicidade da técnica, baixo custo de utilização e grande poder de resolução (OLIVEIRA et al., 2006). Estes tipos de marcadores atendem as necessidades dos curadores de

germoplasma e melhoristas de plantas em busca de técnicas capazes de detectar alto nível de polimorfismo de forma otimizada e com baixo custo.

Marcadores microssatélites têm sido utilizados para fins de melhoramento e seleção, a exemplo dos estudos relacionados à construção de mapas genéticos (CHEN et al., 2007; EUSTICE et al., 2008), diferenciação sexual (PARASNIS et al., 1999; SANTOS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007) e seleção assistida por marcadores (OLIVEIRA et al., 2010a; PINTO et al., 2013), bem como em diversos estudos de diversidade genética para fins de organização e caracterização de bancos de germoplasma (OCAMPO PÉREZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010b; BROWN et al., 2012). Por outro lado, mesmo com a disponibilidade do genoma completo do mamoeiro (variedade 'SunUp' - MING et al., 2008), marcadores do tipo minissatélites não tem sido relatados na cultura do mamoeiro.

Para estudos genéticos em grande escala, técnicas de detecção de polimorfismo baseadas em repetições de bases em tandem têm sido utilizadas em diversos organismos, sendo os marcadores microssatélites mais frequentemente usados quando comparado com os minissatélites (ECKERT et al., 2005). Diferentemente dos microssatélites, que possuem motivos curtos (1- 4 nucleotídeos), os minissatélites são representados por motivos maiores (6- 100 nucleotídeos) (VERGNAUD e DENOEUDE, 2000). De acordo com Jeffreys et al. (1985), os minissatélites são encontrados de forma dispersa no genoma, geralmente em regiões não codificantes e hipervariáveis, devido à variação do número de unidades de repetição em cada loco.

Os minissatélites possuem as mesmas vantagens dos microssatélites, porém são mais facilmente obtidos pelo fato de não necessitarem da análise em géis de poliacrilamida e equipamentos sofisticados para visualização dos fragmentos, considerando que os motivos dos minissatélites podem ser analisados em géis de agarose, o que torna a técnica bastante atraente para diversos estudos moleculares. Com intuito de facilitar a análise dos minissatélites, Heath et al. (1993) desenvolveram uma técnica chamada *Directed Amplification of Minisatellite Region DNA* (DAMD) para amplificação destes locos com base na PCR. Contudo, a técnica baseia-se na análise multilocos tendo em vista o uso de apenas um iniciador com repetições de minissatélites na PCR. Além disso, outra desvantagem é que nem todos os fragmentos de DAMD contêm essencialmente sequências de minissatélites (KARACA e INCE, 2008). Por outro lado, a

disponibilidade de informações sobre o genoma de diversas espécies tem permitido o desenvolvimento de marcadores minissatélites loco- específico (POUWELS e SIMONS, 2003; BALLY et al., 2010), com as vantagens técnicas dos marcadores codominantes. Além disso, microssatélites possuem fragmentos alélicos que variam por poucos pares de bases (pb) (usualmente de 1 a 4 pb), fazendo com que haja uma distância muito reduzida entre os fragmentos de DNA, o que torna a definição dos *bins* alélicos difícil e imprecisa (CRYER et al., 2006; SEEB et al., 2007). Além destes fatores, frequentemente observa-se uma grande quantidade de *stutter* (picos fantasmas) que podem gerar erros na definição precisa dos genótipos (WEEKS et al., 2002).

Diante da necessidade de detecção de polimorfismos moleculares em acessos de mamoeiro com elevado grau de relacionamento, o presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de marcadores codominantes (microssatélites e minissatélites) no entendimento das relações genéticas entre acessos, considerando parâmetros básicos que caracterizam os locos marcadores, além de indicadores de diversidade e estrutura genética.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material genético**

Para comparar a eficiência dos marcadores micro e minissatélites na detecção de polimorfismo, foram utilizados 24 acessos de mamoeiro pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF). Estes acessos foram coletados em diversos países, sendo representados por genótipos não melhorados ou que passaram por algum processo de melhoramento (Tabela 1).

### **Extração e quantificação de DNA**

O DNA dos acessos selecionados foi extraído de folhas frescas, de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. A quantificação foi feita após eletroforese de alíquotas de cada amostra, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas de DNA do fago Lambda (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), em géis de agarose a 1,0%. A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual das

intensidades das bandas, reveladas pela coloração com brometo de etídio (1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ). Posteriormente, o DNA de trabalho foi padronizado para 2,5  $\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Descrição dos acessos de mamoeiro utilizados nas análises genéticas com marcadores minissatélites e microssatélites.

<b>Acessos</b>	<b>Origem</b>	<b>Germoplasma</b>	<b>Tipo do fruto</b>	<b>Sistema reprodutivo</b>
CMF008	Malásia	Melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF011	Costa Rica	Não melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF017	Taiwan	Não melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF024	Costa Rica	Cultivar	Formosa	Ginodióico
CMF038	Brasil	Melhorado	Comum	Ginodióico
CMF054	Havaí	Não melhorado	Solo	Ginodióico
CMF068	Brasil	Melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF082	África do Sul	Melhorado	Solo	Ginodióico
CMF102	Brasil	Não melhorado	Comum	Ginodióico
CMF108	África do Sul	Melhorado	Comum	Ginodióico
CMF115	África do Sul	Melhorado	Comum	Ginodióico
CMF123	Tailândia	Cultivar	Formosa	Ginodióico
CMF125	Havaí	Melhorado	Comum	Ginodióico
CMF128	Brasil	Cultivar	Solo	Ginodióico
CMF129	Brasil	Não melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF134	Brasil	Não melhorado	Comum	Dióico
CMF135	Brasil	Não melhorado	Comum	Ginodióico
CMF138	Brasil	Melhorado	Solo	Ginodióico
CMF142	Brasil	Melhorado	Formosa	Ginodióico
CMF143	Brasil	Melhorado	Solo	Ginodióico
CMF147	Brasil	Melhorado	Solo	Ginodióico
CMF157	Brasil	Não melhorado	Comum	Dióico
CMF165	Brasil	Não melhorado	Comum	Dióico
CMF189	Brasil	Não melhorado	Formosa	Dióico

### **Caracterização Molecular**

Inicialmente foram analisados 66 marcadores minissatélites, desenvolvidos por meio de *screening* no genoma de *C. papaya* L. (Tabela 2) e 107 marcadores microssatélites, sendo 72 pares de iniciadores desenhados por Oliveira et al. (2010b) (Tabela 3) e 33 pares derivados de um mapa de ligação do mamoeiro (CHEN et al., 2007) (Tabela 4).

**Tabela 2.** Características dos 66 locos minissatélites de *Carica papaya* L., contendo a sequência dos iniciadores e a temperatura de anelamento (TA) utilizada nas reações de PCR.

Loco	Iniciador 5' ( <i>forward</i> )	Iniciador 3' ( <i>reverse</i> )	TA* (°C)
CPMini-01	caacggaagttgctgccta	caaggcgtgatcttgttga	62
CPMini-03	tgtgtcattgtggcattgg	ggtgaggagtcggcttcat	50
CPMini-04	gcagaaacagagccgaaat	agcagccttcatagctgaaa	49
CPMini-07	gctcgcacgtcttcatcttt	catggaggaggatgcaatta	63
CPMini-08	gccatgaaatccaaaaagga	aagagaagagttcccgcaca	58
CPMini-09	ttgtgcgataaccatttcca	gccattttgcaagtgaag	62
CPMini-10	ggcgggtttttgtgaaatta	gcccaaagccttgaatct	60
CPMini-12	gcatgattggcatgtatgaa	ttccgccagaaaattagcc	58
CPMini-13	ccaaagagtgcgtgattgg	ggccaagtgggagagattt	62
CPMini-14	tttttaggaggcaaccctga	ccacaccatgcagctctgt	60
CPMini-15	gatccgggaggcttatgaa	tgacaaaaagttgacccaaa	60
CPMini-16	tgcaaaaattcagccctctc	ctgtttgtgccgcgtatt	62
CPMini-19	ttgctagcctgaccaaga	ggggtgaaacaaacaatgg	58
CPMini-21	ccgacttccatctgcttca	gttccactcccttgggtgct	61
CPMini-22	aaaggctatggcccaaaaa	gcaaaattgcatggaaatga	60
CPMini-24	ggccatcaggttttctttt	ctggcctactttgcacacct	58
CPMini-25	cttcggattgtgtgggtta	ttggggctctgacgaatta	58
CPMini-26	tcaaaatcccctgggttga	taaatccccaagccctaaa	62
CPMini-27	gatcagtgggatcgagaga	cgctgcgtcacttattgttg	64
CPMini-28	tatgccaaccctgtttctc	gaccgaaccacaatttctcc	58
CPMini-29	tgcacacactcaatcacacg	gccttgttgcaagtgaag	64
CPMini-30	cgggttacacgtcatccag	ggcggagatggctagttt	56
CPMini-31	ccggaggaagccctaaaa	gattctccgccttttctgt	58
CPMini-32	gcgtaagctcatccctcaa	ccccggtccacttgaatc	60
CPMini-35	caagcaatcggaagaagca	cgcccgcactaaatgaact	58
CPMini-36	cagcattggtgcattaacct	agtggatgggtggttga	58
CPMini-37	catcgacgggagagacaga	tcaccatgcgtcatcataca	60
CPMini-38	cagcccgttatgaacatcg	agcactcctttccccaaa	60
CPMini-39	gggagggagagagaacgag	gcgtccctgaaccttgag	58
CPMini-40	tccttactcccctattcct	gaaaagagagaccgggagaa	58
CPMini-41	cgcagtcaggggtaaaaact	ggcccttgtgtttgttga	58
CPMini-42	ccttgtgattcatgattagg	tgataaaggcctcattttc	55
CPMini-43	ccaaccagggtcaaatgaa	tgtggagagagatggtgggtg	61
CPMini-44	gcacattttatggggagga	gtctctgacacgaacccaaa	58
CPMini-45	ggaaccttccaccgagat	taacggcgtgtcgtgttg	58
CPMini-46	cacatgtaaaccctgtagg	ctaattctgacggcaaatga	58
CPMini-47	tatgggttcccgaatcgt	ccactacgatgatcccaga	58
CPMini-48	ttctcaggtagccagcaa	gggcagcagcaataaagaa	58
CPMini-49	aagctgaccaggcatccta	ggagtcacgagtatccatgc	63
CPMini-51	ccatcatccactactgacc	atgaaagtgggtgctgttc	63
CPMini-52	agaatgagtgggggcaat	ggcgacctctgtcacct	60
CPMini-53	ccaaaaacgttacttgtgaaa	aggaccaccgcctaattc	60



**Tabela 2.** Cont...

<b>Loco</b>	<b>Iniciador 5' (<i>forward</i>)</b>	<b>Iniciador 3' (<i>reverse</i>)</b>	<b>TA* (°C)</b>
CPMini-55	aacatatgcacatgctgacc	ggcgttgggggtagag	63
CPMini-56	ccgtgcgaccaatagta	ggccattgtggacacatc	62
CPMini-57	cagcgcaccaacatcata	ctgcgggaaagaaggaag	60
CPMini-58	catattggagtgattatgaca	tgaacatccccacttgat	55
CPMini-59	cgaggactgacttttcttc	ggcctgtgtcattgagttg	62
CPMini-60	ttgggatcccttctacc	catttggcactggaacg	63
CPMini-61	atttggcgcacacttc	acgggcaagagaaaggaa	60
CPMini-62	gaatcatggtcgggtagaga	agtggccttccctctca	62
CPMini-63	cccattgggtgtttgt	agcctttgtgctgttg	55
CPMini-64	cttcgtgcgaaggcagt	caagcgggtactcaataaa	62
CPMini-65	cacccagtatgtgtgctgac	ccaggggtcaaagaccat	63
CPMini-66	aatgtggcgcacatttg	agagttgccggaaaggag	60
CPMini-69	tccaactttgttctga	ggccaaaaccctattcg	45
CPMini-70	ggcttcgcacagaggta	agagcgcattattcaaca	64
CPMini-71	cagcttcgtgtgaaggta	ttggtatatggcacctca	62
CPMini-72	atgcatgccttcccttt	tcttgggtcccacatctc	50
CPMini-75	ccaacagccccttaca	tgggagcctatggagaca	62
CPMini-76	caaaaataaaattatgggtgt	agagaaaacgaggggaga	55
CPMini-77	ccacccttctaaaaattca	gtttggtaaaatagatttga	58
CPMini-78	gatgagggggcgtgtgt	cccataaatacaccggcagt	60
CPMini-79	atgcgacgtaccagcaac	cggcgaaggagagagaaa	60
CPMini-80	acacaagactcatcaacatgg	caccgacattagggttcg	60
CPMini-82	gggttgcactactcgtg	ttgcacatgcatcccta	50
CPMini-83	ttaatttctctgcccaaca	tgacaactgttttatttga	50

**Tabela 3.** Características dos 72 locos microssatélites de *Carica papaya* L., desenvolvidos por Oliveira et al. (2010b), contendo a sequência dos iniciadores e a temperatura de anelamento (TA) utilizada nas reações de PCR.

<b>Loco</b>	<b>Iniciador 5' (<i>forward</i>)</b>	<b>Iniciador 3' (<i>reverse</i>)</b>	<b>TA* (°C)</b>
CP02	aggcgaatcggaagagag	ctggtaaaacgacgatgacg	59
CP03	gaaggcccgtgtaagtgc	tgggaaaattggaaaggag	58
CP05	gtcctcaatccgaagcat	catacacccttggctct	57
CP06	ttgccaccaggcttaat	tgacgttacggttcatctg	58
CP07	cctagcattgccttgaggtc	gcccactattcacattcacacc	60
CP09	ccaattcatgtccaaatcc	atgttgaccaaaggaagcaa	59
CP10	aaaaatcacagcacgtatggtt	gaaattacaaatgggcaaaaag	58
CP11	tgccgtatgagaaggaattaga	tctctcctccaaacattcattt	58
CP14	tcaatgttctcgtcgatagtc	tgggatagtgcaaattggt	56
CP16	tcaactatttccccgcata	cacctcctgtccaaagggt	60
CP18	ccgcatgtttcgtttt	caattctcgttgattcttg	57
CP19	taggggttgcgtccata	agcaggctaaaaactggtca	58
CP20	tgtgagattgtctgttggtg	gggctcgaaaatcaaacat	58

Tabela 3. Cont...

Loco	Iniciador 5' ( <i>forward</i> )	Iniciador 3' ( <i>reverse</i> )	TA* (°C)
CP21	atcgaccgaggaaggtacg	tcaaaaaccattgagctcgc	60
CP22	gttcgctgctctacgtgt	tgacacctgataaaggcaaga	59
CP23	aacaataggaagcaagctca	tccattccaaccacaaa	57
CP24	cgagcactctcaccattgc	ctgcaaaatccccgaaact	60
CP26	gccgcccgaataaaagta	tggtatactcccacgatggc	60
CP27	aaaagacggcatctgtgact	tttctatcccaccgcacaa	58
CP28	tgtcagttcacactgcaaat	ggacattactcgttgacacc	56
CP29	gggtcgcattgtaacgaat	ttcaaaacctcccaccctta	58
CP30	ggaagaagaggcctgtatgg	gatctggatgtcgcattgt	58
CP31	aagggtagtcatggagca	tctgtcgcctttatactctg	57
CP33	tgacccccagtttctgatt	tggtgtagcgtccattgtg	59
CP35	ggacgaagctccacaatca	ggcaatcaaaccaaatgagg	59
CP36	gcaagaaagcaacttgtaa	tcagacaatgactgttactgc	55
CP38	ttctttacagttgctgcat	aacaagtccccgttttca	57
CP40	atagccatctccctgagc	gacaggcagggggttttac	60
CP42	aacagctctctctaccttg	ttttaggggatgattgaag	56
CP44	tgacaacgaactacatcccta	cctcatggttgtgtactcct	56
CP47	gagcagattgtcacatgcaga	ccagaatgccaattttgct	60
CP48	ccatttctgtcacgcatcc	gatgatgggccaattcag	59
CP49	cctgaaagcaaccatttcta	tcgctggagctgtaagaga	56
CP51	tgaaaaggacccacacgtaa	gcaatcgaatctttcttacc	59
CP52	ggaaagatcatagaaacagtgg	tgctatcttggtgtctctca	55
CP53	cagacacatgaagatttgg	gtgggtccttctccttga	56
CP54	ttaagactatatggccaagc	ttaggtcaaggatgaaacca	56
CP55	tcaaccactctgctccta	caacccttgggctatttg	58
CP56	gaacggcctagcgaagac	cctgcgctaacacttgatga	59
CP57	ttgagctctggttcaactcc	ttcccactatctctgtttg	56
CP58	ttccacgagacaaactgtacg	ctcccaccgctgtacttga	58
CP59	gttgtttgcatcccactgc	ctcgccattccatctggt	60
CP61	ggagtgtatgaagtgcctcat	catgagccctactccgaac	57
CP62	accttgcccaccactatt	ttgattctgctgtgggaga	59
CP63	aaccagcaggctttcataa	ggctcaagagaggcgtat	56
CP64	gggaggacaaagctccaaa	gcatgatccaaggaggag	60
CP66	agtcccatcaggcttctcg	ccttttgtgcgcatatggt	60
CP67	tggcaaaagatggtggtgt	cttgctttgcacttttcagg	59
CP68	agttcctgcatgtgctgct	ccccattctgaaaatctcc	60
CP69	gctgcatcgacatttacgaa	catgtgattccaacaaggcta	59
CP70	cggagctgacgtgactga	gcctgaggagccattaagc	60
CP71	tcccaacctcaagaagataa	ttacaccaccatcgccatc	59
CP72	cccaaatcaccttttctctc	aacgtgaactgagggtgga	58
CP73	gaaaccgctcatttgcatt	ttgattactcccctccatctc	58
CP74	caatgaggggtgataattgg	gctcccccaatgagaatttta	59
CP75	gcgtattgagaggggtgcaa	ttggtagccgtcattcgt	59

**Tabela 3.** Cont...

<b>Loco</b>	<b>Iniciador 5' (<i>forward</i>)</b>	<b>Iniciador 3' (<i>reverse</i>)</b>	<b>TA* (°C)</b>
CP78	ggagtggtgtgtatgttacc	atthtcaccccctttttcc	57
CP79	gcctcagcatccaacaaa	caacctgtgaatggagaacc	60
CP80	gtggcaatgaactcggcta	atcctccctccaccaacag	59
CP81	gaaaaaccggcaaaatcac	ttcaccagattcaccacttg	58
CP82	ccctccccaggaagataca	gaagagtgtttggcggatg	59
CP83	ttcgcaccttgaatccact	ggcagcctttagggttctc	59
CP86	ttcacacggattctacacga	tgggggatatgagaagtttcc	59
CP89	agatgattcaccgctccag	ctcaagcaagaaatatgcctct	58
CP90	cttgggctttcgacctga	agcaatctaattggaggcaaa	59
CP92	ctttttgtcctggccttc	gaacataataccgtgcgttca	59
CP94	tcgcagagaaagagaaagca	tcctctcaccagttattggaa	58
CP95	cagtccttgcaggcgatta	ctcaaccattttcctcacca	60
CP97	tttctgttacctctctcggatt	gagatgacaaccatacagcaa	56
CP98	gattggcgggaaaaactc	agagagagtgtaggaccatgaa	56
CP99	cgaggacaaaacggcacta	tgacgcactctcaaattctc	60
CP100	tgatcgctttcgcttact	gatttactgccacggact	58

**Tabela 4.** Características dos 33 locos microssatélites de *Carica papaya* L., derivados do mapa de ligação do mamoeiro segundo (CHEN et al., 2007), contendo a sequência dos iniciadores e a temperatura de anelamento (TA) utilizada nas reações de PCR.

<b>Loco</b>	<b>Iniciador 5' (<i>forward</i>)</b>	<b>Iniciador 3' (<i>reverse</i>)</b>	<b>TA*(°C)</b>
P3K1200CC	tggctctgaacgaatagtg	tgatcatcatgcatctaccagc	50
P3K3143C0	aagcttgattggctctgatgc	cagcaattaccgtgaccca	50
P6K942CC	tcttcatgcctagtaaccctca	aactttggaggactgaaaagg	50
P3K8229CC	ttcccgaccattctctgtaa	cacatgaactgtcccagca	50
P3K4635CC	gaggatgattgggaggagg	tggccagttgagattcgtga	50
CPM609CC	cggctattatattatccccata	gctgtttgtccagctgtt	60
P3K3187CC	tgagaaagccaacgccaata	tggactaaaaattcaaggtaccca	60
P3K3384CC	cagctcctgctcctctgtctg	aatgaatggtttatgctgtgtg	55
P3K618CC	tcagtcaggggtctgtgtcc	atgccaggggtcagtgtaa	58
P3K472CC	tcccagaaagaatgagcacca	cctttccatgtgcacgaca	50
CPM1100LC0	acgtgggaaaagtccggagta	ttaattaattgttcgcccgc	52
P8K277CC	agagaggcacgaaaggggtc	ccaaaccagcccattttatctt	50
P3K2351CC	tgtgtgatcgcactgggtga	tgagatcccatgtcccac	60
P3K3579CC	tggatctacattttgtctttggc	gcttaccacatgcacagatca	50
P3K5504A5	tgcttccatgacattggtgg	tgacttttgatacatgtccgtgc	52
P3K5988CC	cagggctatcgttatcaaaggc	agttctcctcgcctgtccc	52
P8K594A5	cgggggaaaggtgtattatga	ggtgattgaagtcaacctgatgc	52
CTG-304A5	ggcaatccttttagcgacc	tagtcgtcgccggaatctgt	50
P8K433C0	tccattctcagccaaccct	acacgggtgtcgttagatgc	50

**Tabela 4. Cont...**

<b>Loco</b>	<b>Iniciador 5' (<i>forward</i>)</b>	<b>Iniciador 3' (<i>reverse</i>)</b>	<b>TA*(°C)</b>
P3K3542CC	catcaccaagacgccgtaca	tgggtggtgggatgtagagg	52
P3K150CC	agcagccgtatctcatcgtg	gcgtagcgtgggaaagagag	62
P3K1574CC	tgcgtgcgtgagagtgataga	ccagcccacaagggaaaaat	52
CTG-317CC	gcgtgcgggagaagtaaaaa	tctcttctcatccgtcctcca	50
P6K883CC	tggcacacgtatgattccaa	tgggtctgaattaaaagggaaaa	53
P3K2630CC	acgttgctcaccgtttccac	cctcttccaccgcactatg	50
P3K4745CC	ttttcccatgccaaagaaga	ggtcacgtgagcttaggacataaa	50
P3K163CC	gcgaaagggtgattgattg	ttattgcttctctgcccc	53
P3K3843CC	acagcgacgtggccttacac	aaaaagcgcgagagggagag	55
CPM1019CC	tggatcatcagttctccacg	tcaaaattgtgagatgggca	52
CPM2288CC	tgggattcatcaatttctacccc	ttccaccagcgtaaaggcat	52
CTG-32A0	tgaattgtttgtctggtttcg	tgtcatacagatggatcattggg	50
CTG-718CC	ccaactcacaccattgcca	ttgacaaggaccagtcgtg	54
CTG-395CC	cacacacgttacgtccgaagtc	aggataaaattagccaccctcca	52

As reações foram realizadas em volume final de 15 µL, contendo 10 ng de DNA, 0,2 mM de cada iniciador, 0,5 U de Taq DNA (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil), 0,2 mM de dNTPs, 20 mM de Tris-HCL (pH 8,4), 50 mM de KCl e 1,5 (CPMini01 a 48) ou 2,0 mM (demais minissatélites e todos microssatélites) de MgCl<sub>2</sub>.

As amplificações foram conduzidas em termociclador Veriti® 96-Well (Applied Biosystems, Foster City CA, EUA), empregando-se o seguinte programa: 94°C por 4 min; 30 ciclos a 94°C por 50s, temperatura de anelamento variando de acordo com o iniciador (Tabelas 2 a 4) por 50s, 72°C por 60s; e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1000 (Invitrogen) a 3% (peso/volume), e em seguida corados com brometo de etídio (10mg/mL), visualizados em luz UV e foto documentado no equipamento Carestream Gel Logic 212 PRO (Kodak, Rochester NY, EUA) para posterior análise. O peso molecular dos locos polimórficos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil).

### **Análise da diversidade genética**

As informações moleculares com base nas estimativas das frequências alélicas dos marcadores foram obtidas utilizando: 1) número de alelos por loco; 2) heterozigosidade observada (H<sub>o</sub>), calculada diretamente da amostra a partir das

frequências genóticas; 3) heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), calculada de acordo com Nei (1973):  $H_e = 1 - \sum p_{ij}^2$ , onde  $p_{ij}$  é a frequência do  $j$ th alelo para o  $i$ th loco; 4) Conteúdo de informação polimórfica ( $PIC$ ), de acordo com Botstein et al. (1980)

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2, \text{ em que } k \text{ é o número de alelos e } p_i \text{ e } p_j \text{ são as}$$

frequências dos alelos  $i$  e  $j$ , respectivamente. Também foram realizados testes para presença de desequilíbrio de ligação entre pares de locos. Todas estas estimativas foram calculadas com auxílio do programa PowerMarker v.3.25 (LIU e MUSE, 2005).

$$\text{O índice de Shannon-Wiener foi calculado de acordo com: } H' = - \sum_{i=1}^c P_i \ln(P_i),$$

em que  $c$ : número de classes genóticas para um dado loco e  $P_i$ : frequência do  $i$ -ésimo genótipo. A estatística  $t$  ( $p < 0,05$ ) foi utilizada para testar a existência de diversidade significativa em cada loco marcador, de acordo com:  $t' = H' / \sqrt{V_{H'}}$  em

$$\text{que } V_{H'} = \frac{- \sum_{i=1}^c P_i \ln^2(P_i) - \left[ \sum_{i=1}^c P_i \ln(P_i) \right]^2}{N} + \frac{c-1}{2N^2}, \text{ com } N-1 \text{ graus de liberdade.}$$

A probabilidade de exclusão de paternidade de cada loco marcador ( $Q$  – Weir, 1996) foi calculada de acordo com:

$$Q = \sum_i (1 - p_i)^2 - \frac{1}{2} \sum_i \sum_{i \neq j} p_i^2 p_j^2 (4 - 3p_i - 3p_j), \text{ e cuja probabilidade de exclusão de}$$

paternidade combinada (QC) foi:  $QC = 1 - \prod_i^n (1 - Q_i)$ . A probabilidade de

identidade genética para cada loco ( $I$ ) (PAETKAU et al., 1995) foi obtida pela

$$\text{formula: } I = \sum_i p_i^4 + \sum_i \sum_{j>1} (2p_i p_j)^2, \text{ enquanto a probabilidade de identidade}$$

genética combinada (IC) por meio de  $IC = \prod I_i$ . Em ambos os casos,  $p$  é a frequência populacional dos alelos  $i$  ou  $j$ , cujas estimativas foram obtidas com uso do programa Identity 1.0 (WAGNER e SEFC, 1999).

### **Análise da estrutura populacional**

A estrutura genética dos acessos de mamoeiro foi analisada utilizando o programa *Structure* v.2.3 (PRITCHARD et al., 2000). O número de clusters foi inferido utilizando 20 corridas independentes com 100.000 burn-ins e 100.000

MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) iterações após os burn-ins, utilizando o modelo de mistura, locos não ligados e pressupondo-se que cada acesso pode ter uma fração do genoma oriunda de uma ou mais subpopulação e assumindo que essas subpopulações podem estar correlacionadas. O número de cluster para representar cada conjunto de dados (mini e microssatélites) foi identificado utilizando  $K$  variando de 2 a 10.

O algoritmo do *Structure* v.2.3 pode ser efetivo para inferir o número correto de clusters em conjunto de dados que apresentam alguma relação de isolamento por distância. Nos casos em que os padrões de dispersão entre as populações não são homogêneos, a probabilidade log estimada dos dados não fornece uma estimativa correta do número de clusters. Assim, o método  $\Delta K$  de Evanno et al. (2005) foi estimado com intuito de avaliar se o número inferido de clusters apresentaram resultados sensíveis e confiáveis. Estes métodos são uma estatística *ad hoc* que auxilia o pesquisador a encontrar o valor ideal de  $K$ . Por isso, utilizou-se a estatística  $\Delta K$ , com base na taxa de variação entre os valores sucessivos de  $K$ , para inferir o nível maior de estrutura do conjunto de dados (EVANNO et al., 2005). Neste caso, o *Structure* assume que o genótipo de cada indivíduo em cada loco é totalmente desconhecido.

Após definido o valor de  $K$  grupos, utilizou-se a média das estimativas tradicionais de diferenciação genética baseadas no  $F_{ST}$  das vinte corridas independentes, para avaliação da consistência dos agrupamentos em termos de diferenciação genética.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização dos locos minissatélites e microssatélites

Cerca de 39% dos marcadores minissatélites não apresentaram polimorfismo no conjunto de 24 acessos de mamoeiro (CPMini-12, CPMini-13, CPMini-26, CPMini-29, CPMini-32, CPMini-35, CPMini-38, CPMini-41, CPMini-42, CPMini-45, CPMini-51, CPMini-52, CPMini-53, CPMini-55, CPMini-57, CPMini-58, CPMini-59, CPMini-60, CPMini-61, CPMini-66, CPMini-70, CPMini-71, CPMini-77, CPMini-78, CPMini-79 e CPMini-80) e portanto foram excluídos das análises subsequentes. A taxa de monomorfismo dos minissatélites do mamoeiro foi menor quando comparada aos 87,0% (ECKERT et al., 2005) e 70,2% (BALLY et

al., 2010), observados na análise do fungo *Leptosphaeria maculans*, sendo portanto um indicador da qualidade destes marcadores. No caso dos marcadores microssatélites, aproximadamente 13% dos marcadores não foram polimórficos (CP56, CP64, CP67, CP70, CP74, CP75, CP78, CP79, CP81, CP82, CP90, CP92, CP99 e ctg-304A5), sendo também excluídos das análises. A percentagem de microssatélites monomórficos é menor do que a dos minissatélites, considerando que a escolha dos microssatélites foi baseada em trabalhos prévios (CHEN et al., 2007 e OLIVEIRA et al., 2010b) que demonstraram o potencial destes marcadores na identificação de polimorfismo no mamoeiro.

Os demais 40 locos minissatélites analisados apresentaram-se bastante variáveis tendo sido identificados um total 124 alelos, variando de 2 a 7 alelos por loco (média = 3,10 alelos por loco) (Tabela 5). Sessenta e cinco por cento dos minissatélites apresentaram mais de 3 alelos por loco, sendo que os locos CPMini-21, CPMini-46, CPMini-04 e CPMini-16 foram os mais promissores, tendo pelo menos 5 alelos por loco. Considerando apenas a análise dos 91 locos microssatélites polimórficos nas amostras de mamoeiro foram identificados um total de 325 alelos, com uma média de 3,57 alelos por loco. A maior diversidade alélica foi observada no loco CP16 (8 alelos) e a menor em 23 locos (CP06, CP09, CP11, CP20, CP22, CP23, CP24, CP27, CP28, CP29, CP33, CP36, CP38, CPM2288CC, P3K2351CC, P3K3143C0, P3K3187CC, P3K3579CC, P3K5504A5, P3K5988CC, P6K883CC, P8K277CC e P8K594A5), contendo apenas dois alelos (Tabela 6). Este número médio de alelos está de acordo com observações prévias de outros autores, que encontraram média de 4,02 (OLIVEIRA et al., 2010b) e 4,53 (MATOS et al., 2013) alelos por loco na análise de genótipos brasileiros de mamoeiro. Por outro lado, um maior número médio por loco (6,60) foi encontrado por Ocampo Pérez et al. (2007), na análise de 72 genótipos de mamoeiro com uso de 15 marcadores microssatélites e por Asudi et al. (2013) na análise de 42 genótipos de mamoeiro oriundos de seis regiões produtoras no Quênia, quando foram observados 11,93 alelos por loco.

O menor número médio de alelos identificados nos marcadores minissatélites quando comparados aos microssatélites, pode ser explicado pelo processo natural de mutação de sequências repetidas em tandem, pois quanto maior o motivo da repetição menor o erro de replicação pela polimerase e,

consequentemente, menor a taxa de mutação e a geração de novos alelos (ELLEGREN, 2004).

Vinte e três alelos dos marcadores minissatélites (18,54%) presentes em 19 locos marcadores (CPMini-01, CPMini-04, CPMini-08, CPMini-09, CPMini-14, CPMini-15, CPMini-16, CPMini-21, CPMini-22, CPMini-27, CPMini-28, CPMini-46, CPMini-48, CPMini-56, CPMini-64, CPMini-69, CPMini-72, CPMini-82 e CPMini-83) foram classificados como raros (frequência  $<0,05$ ) (Tabela 5), enquanto que nos microsatélites foram observados 45 alelos raros (13,85%) no conjunto de germoplasma avaliado. De acordo com Asudi et al. (2013), no primeiro estudo referente à caracterização genética do germoplasma de mamoeiro do Quênia utilizando marcadores microsatélites, não foram observados alelos raros na população. Isto reforça a importância da identificação, com base em marcadores moleculares, e a preservação destes alelos raros no germoplasma do Brasil.

O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 130 a 975 pares de bases (pb) nas análises com minissatélites e entre 90 a 610 nas análises com os microsatélites. Esta variação nos tamanhos dos alelos está de acordo com a literatura (CHEN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010b), confirmando que pequenos ajustes nas condições de reação da PCR e temperatura de anelamento dos marcadores não interferiram na qualidade dos resultados e na obtenção da amplificação da região alvo correta.

Os valores de  $H_e$  para os minissatélites variaram de 0,04 (CPMini-22) a 0,76 (CPMini-16), com média de 0,42, enquanto os valores de  $H_o$  variaram de 0,00 (CPMini-07, CPMini-10, CPMini-14, CPMini-19, CPMini-25, CPMini-30, CPMini-36, CPMini-43, CPMini-44, CPMini-49, CPMini-56, CPMini-62, CPMini-63, CPMini-64, CPMini-69, CPMini-72 e CPMini-75) a 1,00 (CPMini-03), com média de 0,11, indicando excesso de indivíduos homocigóticos e baixos níveis de polimorfismo nesta coleção de germoplasma de mamoeiro. No caso dos microsatélites, a  $H_e$  média foi de 0,52, com valor mínimo de 0,12 (CP20) e máximo de 0,81 (CP16 e CP95), enquanto que a  $H_o$  média foi de 0,16 com variação de 0,00 (CP22, CPM2288CC, CP63, P3K3384CC, CP68, P3K3187CC, CP89, CP28, CP09, CP27, CP69, CP52, CP80, CP47, CP97, CP14, CPM1019CC, CP100, CP59, CP57, CP55, CP83, CP94, CP72, CP73 e CP95) a 1,00 (CP31). Os parâmetros de heterozigosidade foram ligeiramente mais elevados para os marcadores microsatélites em comparação com os



minissatélites. Além disso, estes parâmetros estão próximos aos observados por outros autores na análise genética do mamoeiro com marcadores microssatélites, cuja variação de  $H_o$  foi de 0,00 a 0,85 (média de 0,19 - OLIVEIRA et al., 2010b), 0,48 a 0,88 (média de 0,62 - ASUDI et al., 2013) e 0,00 a 1,00 (média de 0,20 - MATOS et al., 2013). Em ambos tipos de marcadores, os valores de  $H_o$  foram menores do que os valores de  $H_e$ , indicando os desvios de cruzamentos aleatórios, devido ao isolamento entre os diferentes acessos. Contudo, possivelmente a diversidade genética foi menor neste estudo pelo menor número de acessos de mamoeiro utilizados, bem como pelo fato da maioria dos acessos serem ginodióicos, culminando com altas taxas de autofecundação e consequente redução da heterozigosidade e eventuais derivas genéticas. De fato, a análise da diversidade genética entre cultivares de mamoeiro e espécies relacionadas utilizando marcadores AFLP mostrou limitada diversidade genética em *C. papaya*, cujos resultados foram atribuídos em parte à endogamia presente nas cultivares predominantemente hermafroditas (KIM et al., 2002).

Os valores de PIC para os marcadores minissatélites variaram de 0,04 (CPMini-22) a 0,73 (CPMini-16) (média de 0,38), enquanto que o índice de diversidade de Shannon-Wiener variou de 0,17 (CPMini-56) a 1,92 (CPMini-21), com média de 0,85. Apenas três marcadores minissatélites (CPMini-22, CPMini-56 e CPMini-72) apresentaram índice de diversidade de Shannon-Wiener não significativos (Tabela 5). Para os microssatélites, os valores de PIC para os marcadores microssatélites variaram de 0,11 (CP20) a 0,79 (CP95), com uma média de 0,47. O índice de diversidade de Shannon-Wiener variou de 0,29 (CP22 e CPM2288CC) a 2,20 (CP16), com média de 1,10. Dos marcadores microssatélites, o  $H'$  foi não significativo apenas para os locos CP22 e CPM2288CC (Tabela 6). Os valores de PIC dos microssatélites estão próximos aos observados por Oliveira et al. (2010b), ao analisarem 96 acessos de mamoeiro, cuja variação foi de 0,08 a 0,81, com PIC médio de 0,53.

**Tabela 5.** Número de alelos por loco ( $N_A$ ), variação do tamanho em pares de base (pb), número de genótipos ( $N_G$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), índice de diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e número de alelos raros ( $N_{AR}$ ) referente à caracterização de 40 iniciadores minissatélites polimórficos em 24 acessos de *Carica papaya* L.

Marker	$N_A$	Varição (pb)	$N_G$	$H_E$	$H_O$	PIC	$H'$	$N_{AR}$
CPMini-01	4	340-400	6	0,56	0,25	0,49	1,44	1
CPMini-03	2	350-650	1	0,50	1,00	0,38	-	-
CPMini-04	6	330-500	8	0,75	0,29	0,71	1,86	2
CPMini-07	2	950-960	2	0,31	0,00	0,26	0,49	-
CPMini-08	3	290-310	3	0,34	0,08	0,31	0,65	1
CPMini-09	3	285-300	3	0,16	0,08	0,15	0,46	2
CPMini-10	3	960-975	3	0,67	0,00	0,59	1,10	-
CPMini-14	3	745-755	3	0,32	0,00	0,29	0,59	1
CPMini-15	4	480-500	5	0,46	0,13	0,42	1,00	1
CPMini-16	7	130-170	8	0,76	0,25	0,73	1,77	1
CPMini-19	2	450-460	2	0,41	0,00	0,32	0,60	-
CPMini-21	5	350-420	9	0,68	0,38	0,62	1,92	2
CPMini-22	2	400-410	2	0,04	0,04	0,04	0,18 <sup>ns</sup>	1
CPMini-24	2	160-180	3	0,49	0,04	0,37	0,83	-
CPMini-25	2	220-230	2	0,28	0,00	0,24	0,45	-
CPMini-27	3	330-390	4	0,48	0,17	0,40	1,10	1
CPMini-28	3	280-310	3	0,19	0,13	0,18	0,54	1
CPMini-30	3	450-475	3	0,35	0,00	0,32	0,65	-
CPMini-31	3	285-305	3	0,35	0,17	0,32	0,80	-
CPMini-36	2	390-400	2	0,49	0,00	0,37	0,68	-
CPMini-37	4	345-370	6	0,66	0,33	0,60	1,55	-
CPMini-39	3	280-300	5	0,62	0,25	0,54	1,45	-
CPMini-40	3	390-410	4	0,49	0,13	0,43	1,04	-
CPMini-43	2	780-790	2	0,26	0,00	0,22	0,42	-
CPMini-44	3	380-390	3	0,60	0,00	0,53	1,01	-
CPMini-46	5	320-355	5	0,42	0,04	0,39	0,87	2
CPMini-47	3	400-420	4	0,66	0,41	0,58	1,18	-
CPMini-48	4	320-350	6	0,65	0,13	0,58	1,41	1
CPMini-49	2	310-320	2	0,22	0,00	0,19	0,38	-
CPMini-56	2	250-265	2	0,08	0,00	0,08	0,17 <sup>ns</sup>	1
CPMini-62	3	240-260	3	0,45	0,00	0,41	0,80	-
CPMini-63	2	440-450	2	0,16	0,00	0,15	0,30	-
CPMini-64	3	820-850	3	0,23	0,00	0,21	0,46	1
CPMini-65	2	170-190	3	0,38	0,17	0,30	0,87	-
CPMini-69	3	220-240	3	0,30	0,00	0,27	0,56	1
CPMini-72	2	200-210	2	0,09	0,00	0,08	0,18 <sup>ns</sup>	1
CPMini-75	2	460-470	2	0,35	0,00	0,29	0,54	-
CPMini-76	4	170-185	5	0,74	0,04	0,69	1,47	-
CPMini-82	4	200-220	5	0,53	0,04	0,47	1,04	1
CPMini-83	4	200-220	5	0,53	0,04	0,47	1,04	1
Média	3,10		3,68	0,42	0,11	0,38	0,85	0,58

ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

**Tabela 6.** Número de alelos por loco ( $N_A$ ), variação do tamanho em pares de base (pb), número de genótipos identificados ( $N_G$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), índice de diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e número de alelos raros ( $N_{AR}$ ) referente à caracterização de 91 iniciadores microssatélites polimórficos em 24 acessos de *Carica papaya* L.

Marcador	$N_A$	Varição (pb)	$N_G$	He	Ho	PIC	$H'$	$N_{AR}$
CP02	3	144-158	3	0,59	0,33	0,52	1,09	-
CP03	4	238-276	7	0,59	0,25	0,54	1,57	-
CP05	4	290-320	5	0,66	0,04	0,60	1,28	-
CP06	2	240-320	3	0,46	0,04	0,35	0,79	-
CP07	4	175-208	5	0,67	0,42	0,61	1,40	1
CP09	2	395-411	2	0,44	0,00	0,35	0,64	-
CP10	6	180-202	9	0,77	0,23	0,73	1,92	2
CP100	4	282-305	4	0,63	0,00	0,58	1,16	-
CP11	2	568-610	3	0,30	0,29	0,26	0,76	-
CP14	5	217-232	5	0,61	0,00	0,53	1,12	3
CP16	8	202-240	11	0,81	0,71	0,78	2,20	2
CP18	4	238-260	7	0,54	0,21	0,48	1,42	1
CP19	3	156-166	4	0,54	0,21	0,43	1,19	1
CP20	2	248-252	2	0,12	0,13	0,11	0,38	-
CP21	4	142-158	7	0,56	0,25	0,51	1,48	-
CP22	2	246-254	2	0,15	0,00	0,14	0,29 <sup>ns</sup>	-
CP23	2	218-236	3	0,44	0,08	0,35	0,86	-
CP24	2	236-246	3	0,19	0,13	0,17	0,54	-
CP26	3	142-152	4	0,39	0,05	0,35	0,78	-
CP27	2	347-353	2	0,48	0,00	0,36	0,67	-
CP28	2	186-190	2	0,41	0,00	0,33	0,60	-
CP29	2	550-556	3	0,49	0,17	0,37	1,01	-
CP30	5	222-290	7	0,56	0,13	0,53	1,39	1
CP31	4	160-174	2	0,75	1,00	0,70	0,69	-
CP33	2	401-411	3	0,28	0,17	0,24	0,72	-
CP35	5	162-180	7	0,72	0,25	0,68	1,73	1
CP36	2	452-458	3	0,48	0,13	0,36	0,96	-
CP38	2	498-510	3	0,38	0,17	0,30	0,87	-
CP40	3	154-162	4	0,43	0,21	0,38	1,02	-
CP42	5	260-280	8	0,66	0,23	0,62	1,67	1
CP44	4	228-236	5	0,70	0,46	0,65	1,26	-
CP47	4	248-262	4	0,55	0,00	0,50	1,01	1
CP48	3	210-250	3	0,50	0,52	0,43	0,92	-
CP49	4	196-216	5	0,67	0,37	0,61	1,45	-
CP51	3	290-306	5	0,63	0,17	0,56	1,36	-
CP52	3	189-205	3	0,53	0,00	0,47	0,90	-
CP53	5	305-320	5	0,68	0,08	0,62	1,34	2
CP54	7	215-290	8	0,73	0,17	0,69	1,77	1
CP55	5	250-270	5	0,66	0,00	0,62	1,32	1
CP57	3	283-290	3	0,63	0,00	0,55	1,04	-
CP58	3	357-367	4	0,59	0,13	0,52	1,25	-
CP59	5	367-378	5	0,63	0,00	0,57	1,18	2
CP61	6	207-220	7	0,57	0,07	0,55	1,39	-

Tabela 6. Cont...

Marçador	N <sub>A</sub>	Varição (pb)	N <sub>G</sub>	He	Ho	PIC	H'	N <sub>AR</sub>
CP62	4	240-260	7	0,65	0,42	0,58	1,78	1
CP63	3	235-249	3	0,20	0,00	0,19	0,43	-
CP66	3	244-270	4	0,53	0,15	0,43	1,09	1
CP68	3	141-155	3	0,29	0,00	0,26	0,54	1
CP69	4	350-377	4	0,52	0,00	0,48	1,00	-
CP71	5	240-255	9	0,77	0,19	0,73	2,00	-
CP72	4	190-205	4	0,70	0,00	0,64	1,28	-
CP73	5	230-243	5	0,74	0,00	0,69	1,43	1
CP80	3	207-220	3	0,54	0,00	0,48	0,92	-
CP83	4	240-245	4	0,69	0,00	0,63	1,26	-
CP86	3	447-551	4	0,42	0,13	0,35	0,94	1
CP89	3	423-450	3	0,38	0,00	0,34	0,69	-
CP94	4	174-177	4	0,69	0,00	0,63	1,24	-
CP95	6	180-192	6	0,81	0,00	0,79	1,74	-
CP97	3	250-265	3	0,57	0,00	0,48	0,93	-
CP98	4	194-215	3	0,34	0,07	0,31	0,63	2
CPM1019CC	4	130-145	4	0,62	0,00	0,55	1,11	1
CPM1100LC0	4	165-180	4	0,62	0,29	0,54	1,20	1
CPM2288CC	2	175-180	2	0,15	0,00	0,14	0,29 <sup>ns</sup>	-
CPM609CC	4	130-170	4	0,56	0,05	0,47	1,01	2
ctg-317CC	3	190-210	3	0,63	0,38	0,55	1,02	-
ctg-32A0	4	145-165	5	0,64	0,21	0,58	1,33	1
ctg-395CC	6	175-210	10	0,76	0,38	0,72	2,05	1
ctg-718CC	5	175-210	7	0,70	0,22	0,66	1,67	-
P3K119CC	6	115-160	8	0,67	0,46	0,63	1,79	1
P3K1200CC	3	160-180	3	0,30	0,09	0,27	0,58	1
P3K150CC	5	125-165	6	0,61	0,50	0,57	1,59	1
P3K1574CC	4	175-200	4	0,58	0,17	0,53	1,12	-
P3K163CC	4	100-150	4	0,42	0,04	0,39	0,84	1
P3K2351CC	2	130-150	3	0,49	0,29	0,37	1,08	-
P3K2630CC	3	155-165	3	0,30	0,09	0,27	0,67	1
P3K3143C0	2	100-120	2	0,16	0,17	0,15	0,46	-
P3K3187CC	2	180-190	2	0,35	0,00	0,29	0,54	-
P3K3384CC	3	190-210	3	0,23	0,00	0,21	0,46	1
P3K3542CC	4	165-180	5	0,57	0,36	0,51	1,36	1
P3K3579CC	2	170-185	3	0,36	0,22	0,30	0,88	-
P3K3843CC	3	100-120	4	0,45	0,08	0,41	0,92	-
P3K4635CC	5	90-110	6	0,71	0,04	0,67	1,50	1
P3K472CC	4	120-155	4	0,26	0,13	0,25	0,62	2
P3K5504A5	2	160-170	3	0,50	0,09	0,37	0,93	-
P3K5988CC	2	130-140	3	0,45	0,23	0,35	1,00	-
P3K618CC	6	150-210	10	0,79	0,26	0,75	2,07	1
P3K8229CC	3	180-190	3	0,50	0,17	0,43	0,98	-
P6K883CC	2	125-300	3	0,44	0,08	0,35	0,86	-
P6K942CC	3	140-150	4	0,57	0,04	0,50	1,09	-
P8K277CC	2	170-190	3	0,48	0,21	0,36	1,03	-
P8K433C0	3	175-190	4	0,54	0,17	0,43	1,16	1
P8K594A5	2	200-210	3	0,28	0,05	0,24	0,59	-
Média	3,57		4,38	0,52	0,16	0,47	1,10	0,50

ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

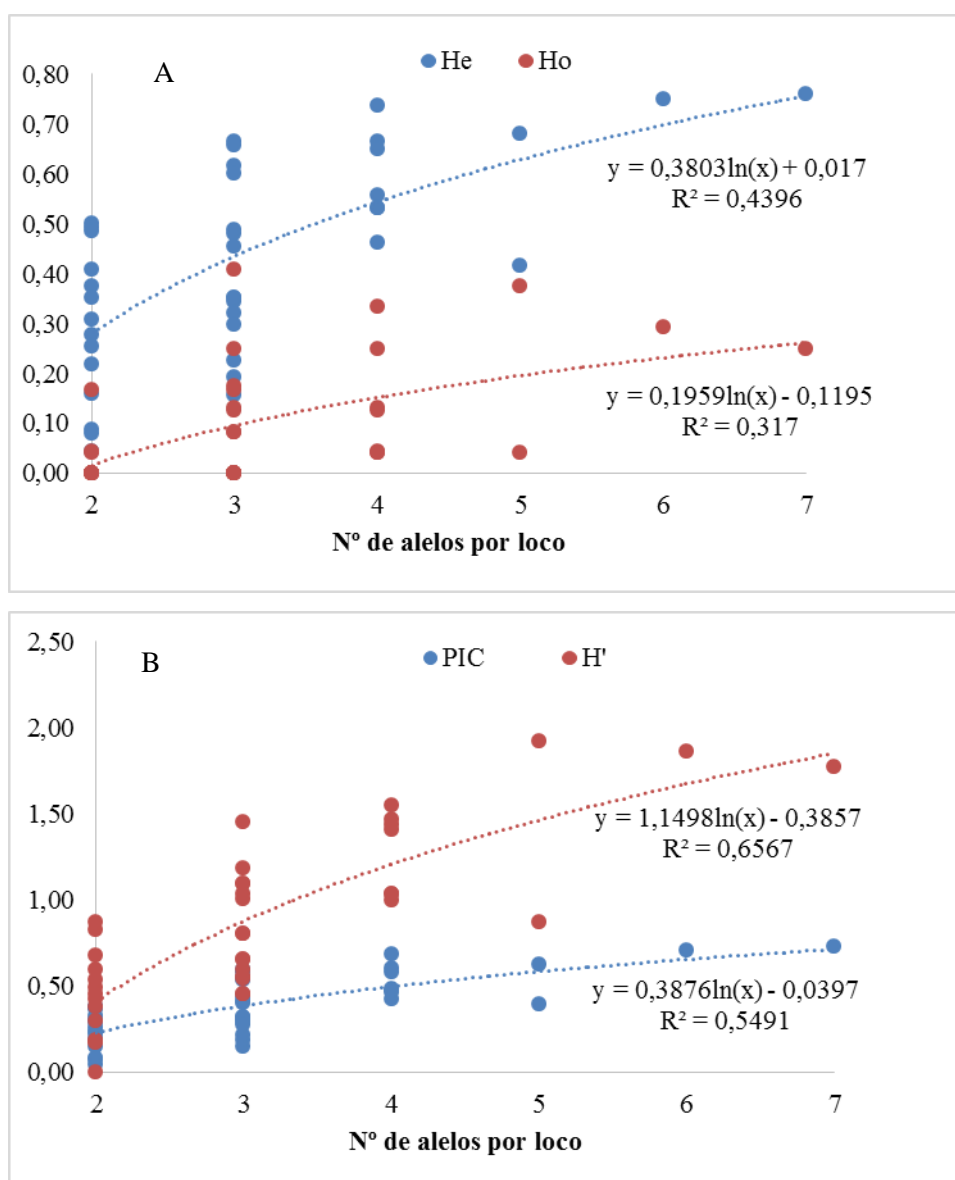
O parâmetro PIC refere-se ao valor do marcador para detecção de polimorfismo numa população, em função do número de alelos e a distribuição de sua frequência. De acordo com Botstein et al. (1980), os valores de PIC podem ser agrupados em três níveis: altamente informativo ( $PIC > 0,5$ ); moderadamente informativo ( $PIC$  entre 0,25 e 0,5) e pouco informativo ( $PIC < 0,25$ ). Com base neste critério, 25%, 50% e 25% dos marcadores minissatélites podem ser considerados altamente, moderadamente e pouco informativos, respectivamente, enquanto no caso dos microsatélites, cerca de 46%, 44% e 10% podem ser considerados altamente, moderadamente e pouco informativos, respectivamente.

Semelhantemente ao número médio de alelos por loco, observou-se menor taxa de polimorfismo e conteúdo informativo em locos minissatélites. Resultados semelhantes foram observados em espécies de *Eucalyptus*, onde foram identificados uma média de 4,42 alelos,  $H_e$  e  $H_o$  médios de 0,55 e 0,46, respectivamente, ao analisarem 21 microsatélites com motivo mínimos de tetranucleotídeos (FARIA et al., 2011). Estes valores são menores se comparados com a análise de nove microsatélites di e trinucleotídeos em duas populações de *E. leucoxylo*, quando foram identificados uma média de 12,3 alelos por loco,  $H_e$  e  $H_o$  médios de 0,83 e 0,72, respectivamente (OTTEWELL et al., 2005).

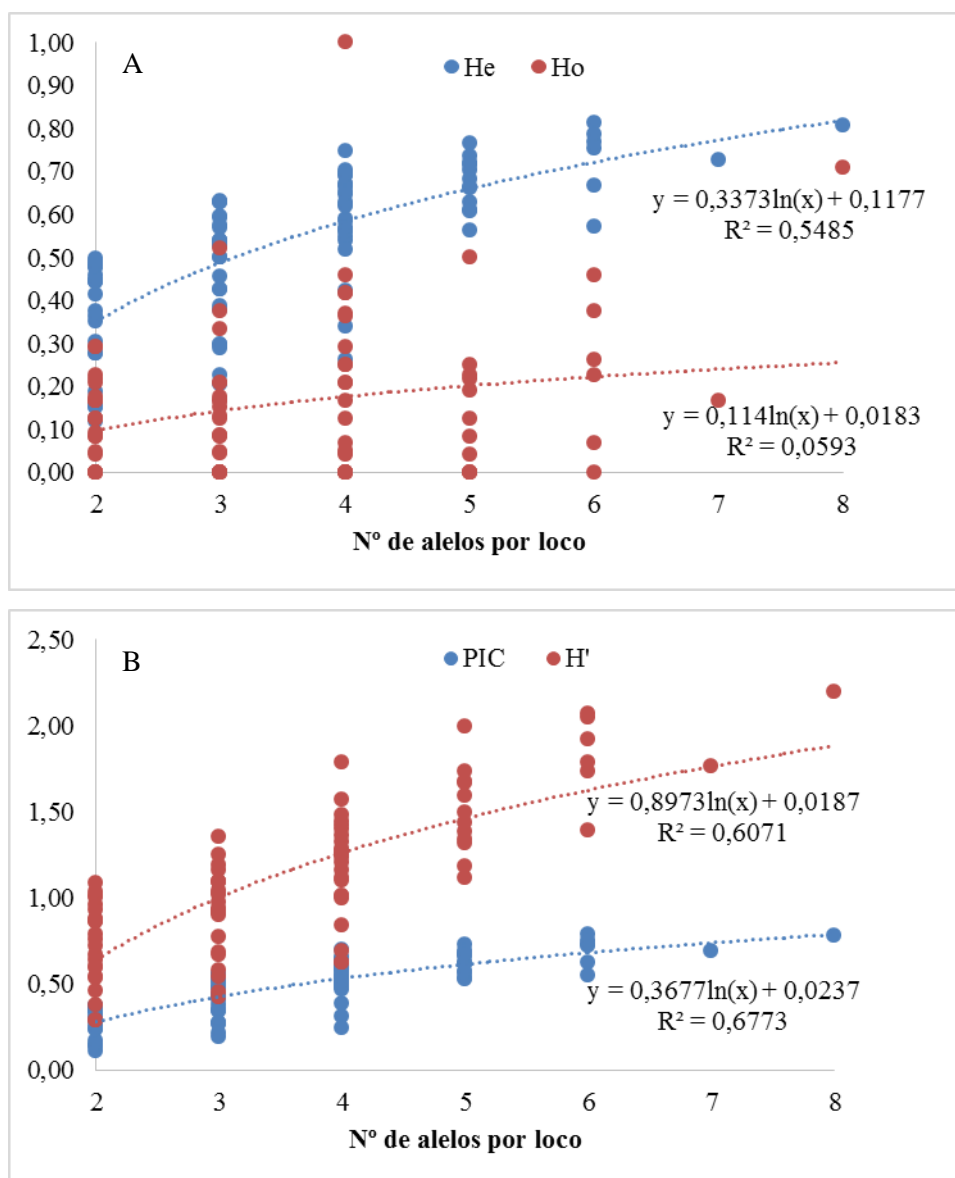
As estimativas  $H_e$ ,  $H_o$ , PIC e  $H'$  para os locos de mini e microsatélites, tanto neste trabalho quanto aquelas obtidas na literatura, indicam que existe uma considerável diversidade genética nestes locos marcadores para as diversas análises genéticas no mamoeiro. Embora não hajam relatos que permitam a comparação dos parâmetros de diversidade dos marcadores minissatélites, tanto os mini quanto os microsatélites foram eficazes na identificação de alelos nos acessos de mamoeiro avaliados. Isto é especialmente importante, considerando que a detecção da variação genética entre indivíduos é uma exigência para qualquer aplicação de marcadores genéticos. Em outras espécies como *Leptosphaeria maculans*, o desenvolvimento e análise de marcadores minissatélites tem-se mostrado de grande importância para o mapeamento genético e estudo de populações (ECKERT et al., 2005). Recentemente, com a grande disponibilidade de sequências de DNA nos bancos de dados e as vantagens inerentes aos marcadores codominantes, têm sido desenvolvidas plataformas de identificação e desenvolvimento de marcadores minissatélites (BALLY et al., 2010). Além disso, o menor número de alelos por loco minissatélite

pode ser vantajoso para o estabelecimento de sistemas e genotipagem multiplex, pois menores variações no tamanho dos alelos permitem o uso de maior número de marcadores no mesmo espectro de detecção de fluorescência (FARIA et al., 2011). Locos com maior número de repetição têm sido utilizados em análises de identidade genética e paternidade em humanos, devido à facilidade de padronização dos painéis de marcadores entre diferentes laboratórios, bem como pela facilidade de implementação de sistemas de genotipagem automatizada (RUITBERG et al., 2001).

Os parâmetros  $H_e$ ,  $H_o$ , PIC e  $H'$  foram positivamente correlacionados com o número de alelos dos marcadores minissatélites e microsatélites havendo, portanto, uma relação linear positiva entre estes índices (Figuras 1 e 2). A análise de correlação simples para os minissatélites (Figura 1) indicou que os índices  $H_e$  ( $r=0,66$ ),  $H_o$  ( $r=0,56$ ), PIC ( $r=0,81$ ) e  $H'$  ( $r=0,74$ ) foram significativamente e positivamente correlacionada com o número de alelos ( $P<0,01$ ). Todavia, a correlação para os parâmetros  $H_e$  e  $H_o$  foi menor em comparação com PIC e  $H'$ . Para os microsatélites, a análise de correlação simples (Figura 2) indicou que os índices  $H_e$  ( $r=0,74$ ), PIC ( $r=0,78$ ) e  $H'$  ( $r=0,82$ ) foram significativamente correlacionados com o número de alelos ( $P<0,01$ ). Por outro lado, não foi observada significância estatística para o parâmetro  $H_o$  ( $r=0,24$ ). Resultados semelhantes foram observados por Chen et al. (2012) ao analisarem uma coleção de trigo chinesa, na qual o  $H_e$  foi correlacionado positivamente com o número de alelos ( $r=0,72$ ,  $P<0,001$ ).



**Figura 1.** Distribuição de: (A) heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho); (B) conteúdo de informação polimórfica (PIC) e índice de Shannon-Wiener (H') em função do número de alelos por loco, referente à análise dos minissatélites.



**Figura 2.** Distribuição da heterozigidade esperada (He) em função do número de alelos por loco, referente à análise dos microssatélites.

### Desequilíbrio de ligação dos marcadores mini e microssatélites

Considerando os 780 pares de combinações para os 40 locos minissatélites, apenas três pares de marcadores (0,38%) (CPMini-82/CPMini-83, CPMini-08/CPMini-09 e CPMini-40/CPMini-43) apresentaram desequilíbrio de ligação significativo ( $p < 0,01$ ). No caso dos microssatélites, das 4.095 combinações para os 91 locos microssatélites, 18 delas (0,44%) (CPM1100LC0/P3K2351CC, P3K1574CC/ctg-317CC, CP53/CP54, CP72/CP73, CP42/CP44, CP49/CP51, CP80/CP83, CP66/CP68, CP55/CP58, CP72/CP80, CP44/CP47, CP59/CP61,



CP23/CP26, CP98/P3K1200CC, P3K3579CC/P3K5504A5, CP23/CP24, CP11/CP16 e CP51/CP53) apresentaram desequilíbrio de ligação significativo ( $p < 0,01$ ).

De fato, de acordo com Chen et al. (2007), os pares de marcadores CPM1100LC0/P3K2351CC, P3K1574CC/ctg-317CC e P3K3579CC/P3K5504A5 estão localizados nos grupos de ligação 4, 7 e 5, respectivamente, muito embora estejam distanciados a 88, 32 e 33 cM uns dos outros, portanto, distantes o suficiente para permitir a análise e detecção de recombinantes entre os marcadores. O marcador P3K1200CC ligado ao CP98 pertence ao grupo de ligação 1.

### **Poder discriminatório dos marcadores minissatélites e microssatélites**

A frequência estimada de alelos nulos para os minissatélites CPMini-03 e CPMini-22 apresentou valores negativos ou próximos de zero, enquanto os demais locos de minissatélites apresentaram valores maiores que 0,06 (Tabela 7). No caso dos microssatélites, os locos CP31, CP48, P3K3143C0 e CP20 apresentaram estimativas negativas, enquanto que para os demais a frequência estimada de alelos nulos variou de 0,01 a 0,45 (Tabela 8). Estes resultados podem ser explicados pela presença de acessos de mamoeiro com alto nível de homozigidade para estes marcadores, tendo em vista que a frequência de alelos nulos é calculada a partir da deficiência de heterozigotos. Portanto, estes altos valores encontrados para as frequências de alelos nulos podem ser devidos à seleção realizada pelos agricultores para tipos específicos de plantas, bem como pelo próprio sistema reprodutivo da espécie, e não especificamente pela presença dos alelos nulos na população.

A potencialidade dos marcadores mini e microssatélites para uso em análises que visam estabelecer vínculo genético entre indivíduos foi estimada por meio da probabilidade de exclusão de paternidade (PEP) e probabilidade de identidade (PI).

A PEP refere-se à probabilidade de excluir uma falsa paternidade. Individualmente (por loco), a PEP variou de 0,02 (CPMini-22) a 0,57 (CPMini-16), com média de 0,22 para os marcadores minissatélites e de 0,06 (CP20) a 0,63 (CP16), com média de 0,29, para os marcadores microssatélites. Segundo Rodrigues et al. (2002) um bom marcador para análise de vínculo genético é

aquele que apresenta altos valores de PEP, sendo adequados valores maiores que 50%. Neste caso, apenas dois minissatélites (CPMini-04 e CPMini-16) e nove microsatélites (CP73, CP31, CP54, ctg-395CC, CP10, CP71, P3K618CC, CP95 e CP16) satisfariam esta condição. Como a PEP é influenciada pelo número de alelos e pela distribuição de frequências desses alelos na população, o baixo número de acessos de mamoeiro utilizados no presente trabalho pode influenciar nestas estimativas. Portanto, ainda será necessário investigar a potencialidade dos demais marcadores para este tipo de análise em um conjunto maior de acessos. Contudo, quando se considera a probabilidade de exclusão combinada (PEC) para todos os locos, os valores chegaram a 0,999 para ambos os marcadores (Tabelas 7 e 8). De acordo com Collevatti et al. (1999) a PEC ideal para testes de paternidade é de 0,999999, portanto, tanto os mini quanto os microsatélites de mamoeiro possuem esta capacidade e podem ser utilizados para esta finalidade.

**Tabela 7.** Estimativa da frequência de alelos nulos (FAN), probabilidade de exclusão de paternidade (PEP) e probabilidade de identidade (PI), referente à caracterização de 40 iniciadores minissatélites polimórficos em 24 acessos de *Carica papaya* L.

Loco	FAN	PEP	PI	Loco	FAN	PEP	PI
CPMini-01	0,20	0,29	0,41	CPMini-39	0,23	0,33	0,37
CPMini-03	0,33	0,19	0,63	CPMini-40	0,24	0,25	0,43
CPMini-04	0,26	0,52	0,19	CPMini-43	0,20	0,11	0,65
CPMini-07	0,24	0,13	0,62	CPMini-44	0,38	0,33	0,36
CPMini-08	0,19	0,17	0,54	CPMini-46	0,26	0,24	0,42
CPMini-09	0,06	0,08	0,73	CPMini-47	0,15	0,36	0,34
CPMini-10	0,40	0,37	0,33	CPMini-48	0,31	0,37	0,33
CPMini-14	0,24	0,16	0,55	CPMini-49	0,18	0,10	0,68
CPMini-15	0,23	0,25	0,41	CPMini-56	0,07	0,04	0,86
CPMini-16	0,29	0,57	0,14	CPMini-62	0,31	0,24	0,43
CPMini-19	0,29	0,16	0,60	CPMini-63	0,14	0,07	0,75
CPMini-21	0,18	0,42	0,27	CPMini-64	0,18	0,11	0,64
CPMini-22	0,00	0,02	0,92	CPMini-65	0,15	0,15	0,60
CPMini-24	0,30	0,19	0,62	CPMini-69	0,23	0,15	0,57
CPMini-25	0,22	0,12	0,64	CPMini-72	0,08	0,04	0,85
CPMini-27	0,21	0,22	0,51	CPMini-75	0,26	0,14	0,61
CPMini-28	0,06	0,10	0,68	CPMini-76	0,40	0,49	0,22
CPMini-30	0,26	0,18	0,51	CPMini-82	0,32	0,28	0,41
CPMini-31	0,14	0,18	0,51	CPMini-83	0,32	0,28	0,41
CPMini-36	0,33	0,18	0,62	Média	0,21	0,22	0,52
CPMini-37	0,20	0,40	0,30	Total/combinada	-	0,999	1,65 <sup>-13</sup>

**Tabela 8.** Estimativa da frequência de alelos nulos (FAN), probabilidade de exclusão de paternidade (PEP) e probabilidade de identidade (PI), referente à caracterização de 91 iniciadores microssatélites polimórficos em 24 acessos de *Carica papaya* L.

Loco	FAN	PEP	PI	Loco	FAN	PEP	PI
CP02	0,16	0,32	0,38	CP69	0,34	0,31	0,34
CP03	0,21	0,35	0,31	CP71	0,33	0,55	0,16
CP05	0,37	0,40	0,30	CP72	0,41	0,44	0,25
CP06	0,29	0,18	0,61	CP73	0,42	0,50	0,20
CP07	0,15	0,40	0,30	CP80	0,35	0,29	0,39
CP09	0,31	0,17	0,60	CP83	0,41	0,43	0,26
CP10	0,31	0,55	0,17	CP86	0,21	0,18	0,55
CP100	0,39	0,38	0,29	CP89	0,27	0,19	0,49
CP11	0,01	0,13	0,62	CP94	0,41	0,42	0,28
CP14	0,38	0,34	0,38	CP95	0,45	0,63	0,11
CP16	0,06	0,63	0,11	CP97	0,36	0,28	0,45
CP18	0,21	0,30	0,38	CP98	0,20	0,18	0,51
CP19	0,21	0,24	0,53	CPM1019CC	0,38	0,35	0,35
CP20	-0,01	0,06	0,80	CPM1100LC0	0,20	0,33	0,38
CP21	0,20	0,32	0,36	CPM2288CC	0,13	0,07	0,75
CP22	0,13	0,07	0,75	CPM609CC	0,33	0,27	0,47
CP23	0,25	0,17	0,60	ctg-317CC	0,16	0,34	0,37
CP24	0,05	0,08	0,71	ctg-32A0	0,27	0,37	0,33
CP26	0,24	0,20	0,49	ctg-395CC	0,22	0,54	0,17
CP27	0,32	0,18	0,61	ctg-718CC	0,28	0,47	0,21
CP28	0,29	0,16	0,60	P3K119CC	0,13	0,44	0,24
CP29	0,21	0,18	0,62	P3K1200CC	0,16	0,15	0,57
CP30	0,28	0,34	0,30	P3K150CC	0,07	0,39	0,26
CP31	-0,14	0,50	0,20	P3K1574CC	0,26	0,34	0,34
CP33	0,09	0,12	0,64	P3K163CC	0,27	0,23	0,44
CP35	0,27	0,48	0,21	P3K2351CC	0,13	0,19	0,62
CP36	0,24	0,18	0,62	P3K2630CC	0,16	0,15	0,57
CP38	0,15	0,15	0,60	P3K3143C0	-0,01	0,07	0,75
CP40	0,15	0,22	0,46	P3K3187CC	0,26	0,14	0,61
CP42	0,26	0,43	0,25	P3K3384CC	0,18	0,11	0,64
CP44	0,14	0,45	0,23	P3K3542CC	0,13	0,32	0,36
CP47	0,35	0,31	0,35	P3K3579CC	0,11	0,15	0,60
CP48	-0,02	0,25	0,45	P3K3843CC	0,26	0,24	0,43
CP49	0,18	0,40	0,30	P3K4635CC	0,39	0,47	0,23
CP51	0,28	0,34	0,36	P3K472CC	0,11	0,14	0,59
CP52	0,35	0,28	0,41	P3K5504A5	0,27	0,19	0,62
CP53	0,36	0,41	0,29	P3K5988CC	0,15	0,17	0,61
CP54	0,32	0,52	0,17	P3K618CC	0,29	0,58	0,14
CP55	0,40	0,44	0,23	P3K8229CC	0,22	0,25	0,45

**Tabela 6.** Cont...

Loco	FAN	PEP	PI	Loco	FAN	PEP	PI
CP57	0,39	0,34	0,37	P6K883CC	0,25	0,17	0,60
CP58	0,29	0,32	0,37	P6K942CC	0,33	0,30	0,38
CP59	0,39	0,37	0,33	P8K277CC	0,18	0,18	0,62
CP61	0,32	0,38	0,25	P8K433C0	0,24	0,24	0,53
CP62	0,14	0,37	0,33	P8K594A5	0,18	0,12	0,64
CP63	0,17	0,10	0,66				
CP66	0,25	0,24	0,51	Média	0,24	0,29	0,43
CP68	0,22	0,14	0,58	Total/combinada	-	0,99	4,33 <sup>-38</sup>

A PI, medida como a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente em uma população apresentarem genótipo idêntico, variou de 0,14 (CPMini-16) a 0,92 (CPMini-22), com média de 0,52 para os marcadores minissatélites e de 0,11 (CP16 e CP95) a 0,80 (CP20), com média de 0,43 para os marcadores microsatélites. A probabilidade combinada de identidade foi de  $1,65^{-13}$  e  $4,33^{-38}$  para os marcadores mini e microsatélites, respectivamente (Tabelas 7 e 8). A PI combinada é a probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente em uma população apresentarem genótipos idênticos para todos os locos, sendo desejado que os valores sejam próximos de zero. Desta forma, também se constatou que tanto os mini quanto os microsatélites de mamoeiro são ótimos marcadores para discriminar indivíduos de mamoeiro, embora seja possível utilizar um menor número de marcadores microsatélites em comparação aos minissatélites para atingir uma mesma PI combinada.

Dentre as técnicas moleculares mais difundidas, os marcadores minissatélites, microsatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) possuem alto potencial para análises de diversidade genética em germoplasma e genótipos melhorados, bem como na análise de parentesco e identificação varietal. Porém, de modo geral os microsatélites são atualmente os mais utilizados para análises de identificação individual e análise de parentesco em diversas espécies (KIRST et al., 2005). Contudo, algumas características dos microsatélites dificultam a análise e diminuem a sua precisão quando comparada com os minissatélites, pois quanto menor o tamanho do motivo, menor será a distância entre alelos e com isso menor a precisão na identificação genotípica dos fragmentos de DNA. Além disso, apresentam uma grande quantidade de *stutter* (picos fantasma) e alelos

microvariantes que adicionalmente dificultam a identificação precisa dos genótipos (WEEKS et al., 2002). Em análises com microssatélites que exigem maior acurácia, os motivos são compostos por no mínimo quatro bases (tetranucleotídeos), a exemplo dos testes de paternidade e genética forense em humanos (RUITBERG et al., 2001). Como os minissatélites são compostos por repetições de no mínimo seis bases, estes requisitos seriam totalmente atendidos.

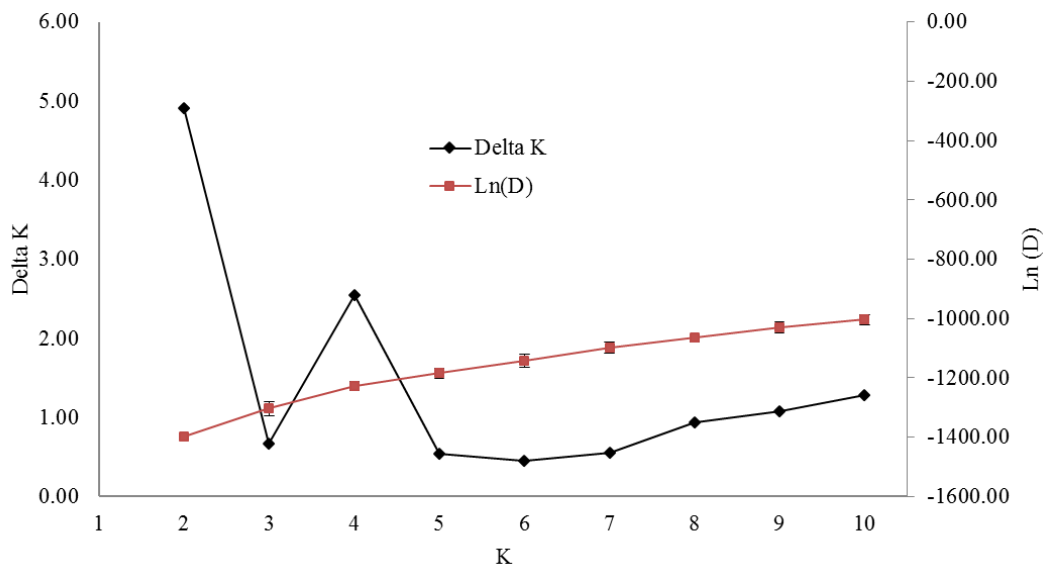
Em mamoeiro e mesmo em outras espécies vegetais, são raros os trabalhos relacionados à determinação da paternidade e identificação individual de genótipos. Porém, o desenvolvimento de um painel contendo 23 SNPs com alto poder informativo para identificação de cultivares de soja, demonstrou que os marcadores moleculares podem ser utilizados como componente auxiliar para descrição e proteção varietal. Mesmo com relativo baixo número de alelos, o poder informativo dos marcadores mini e microssatélites são comparáveis para análises desta natureza na cultura do mamoeiro, considerando as elevadas PEC.

Análises de vínculo genético em mamoeiro são raras e por isso não é possível estabelecer comparações para a cultura. Contudo, em outras espécies como o eucalipto, Kirst et al. (2005) diferenciaram 192 indivíduos de *E. grandis* utilizando seis marcadores microssatélites dinucleotídeos, cuja probabilidade de identidade combinada foi de  $2 \times 10^{-9}$  e a probabilidade de exclusão combinada foi maior que 99,99%. Da mesma forma, Cardoso et al. (2014) diferenciaram 50 cultivares de feijoeiro com base em 24 marcadores microssatélites, com probabilidade de identidade combinada de  $7,05 \times 10^{-17}$  e probabilidade de exclusão combinada maior que 99,99%, resultados, semelhantes aos obtidos na cultura do mamoeiro com uso de marcadores mini e microssatélites.

### **Análise da estrutura populacional com uso dos minissatélites e microssatélites**

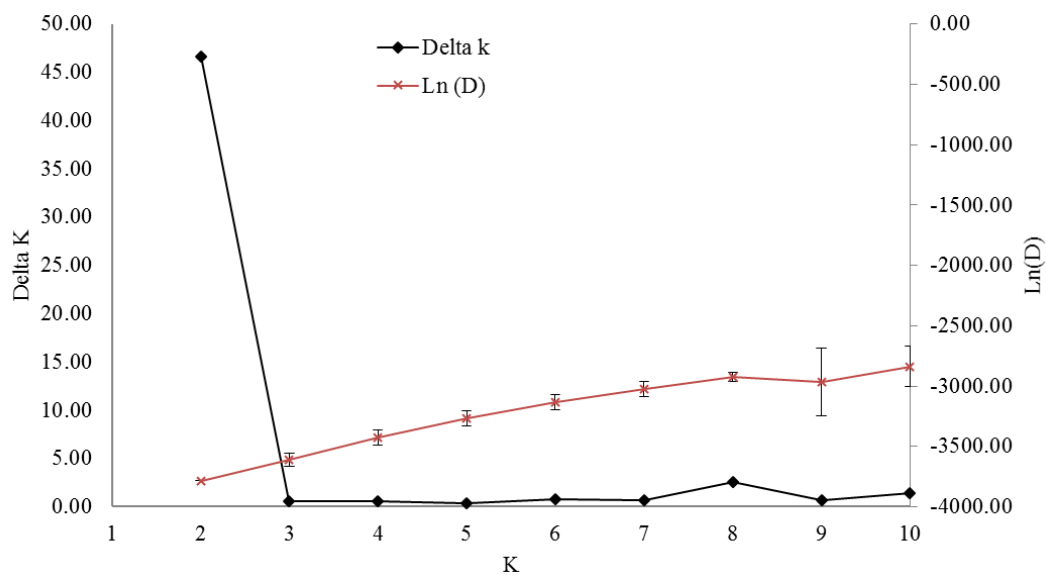
A estrutura populacional dos 24 acessos de mamoeiro foi estimada com base nos marcadores mini e microssatélites, isolada e conjuntamente. Considerando apenas a análise dos marcadores minissatélites, o número de subpopulações (K) identificado com base nos valores da máxima verossimilhança e delta K ( $\Delta K$ ), foi igual a 2, havendo uma subestrutura com K=4 (Figura 3). No caso dos marcadores microssatélites e da análise conjunta dos mini e microssatélites, foram identificadas duas subpopulações (K=2) (Figuras 4 e 5

respectivamente). Neste caso, o algoritmo bayesiano assume a existência de dois grupos genéticos com uma frequência alélica característica para cada loco (PRITCHARD et al., 2000).

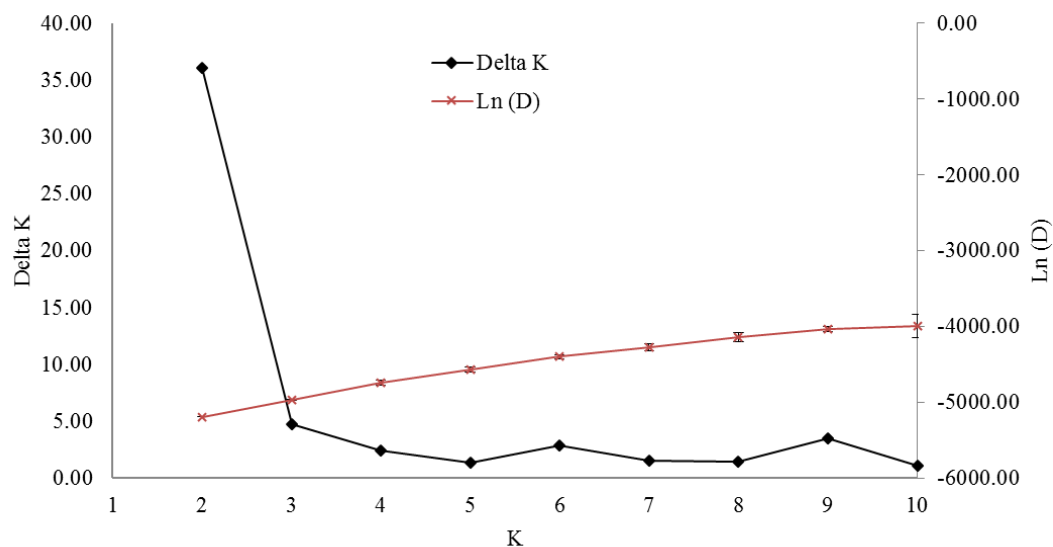


**Figura 3.** Log-verossimilhança e Delta K do software *Structure* v.2.3 com  $K$  variando de 2 a 10, com base na análise dos marcadores minissatélites em 24 acessos de mamoeiro.

A identificação de uma subestrutura ( $K=4$ ) utilizando os marcadores minissatélites indica que estes marcadores podem revelar polimorfismos em regiões genômicas diferentes dos microssatélites e com isso, identificar uma estrutura populacional diferenciada. De fato, a análise genética de 27 genótipos de amoreira com base em marcadores moleculares revelou alta correlação entre as matrizes de distância genética RAPD x ISSR (0,72), em detrimento da correlação minissatélites x RAPD (0,45) e minissatélites x ISSR (0,48) (BHATTACHARYA et al., 2005). Isto indica que as distâncias relativas entre as variedades foram semelhantes entre os marcadores RAPD e ISSR, e ao mesmo tempo bastante diversas com base nos minissatélites.



**Figura 4.** Log-verossimilhança e Delta K do software *Structure* v.2.3 com  $K$  variando de 2 a 10, com base na análise dos marcadores microssatélites em 24 acessos de mamoeiro.



**Figura 5.** Log-verossimilhança e Delta K do software *Structure* v.2.3 com  $K$  variando de 2 a 10, com base na análise conjunta dos marcadores micro e minissatélites em 24 acessos de mamoeiro.

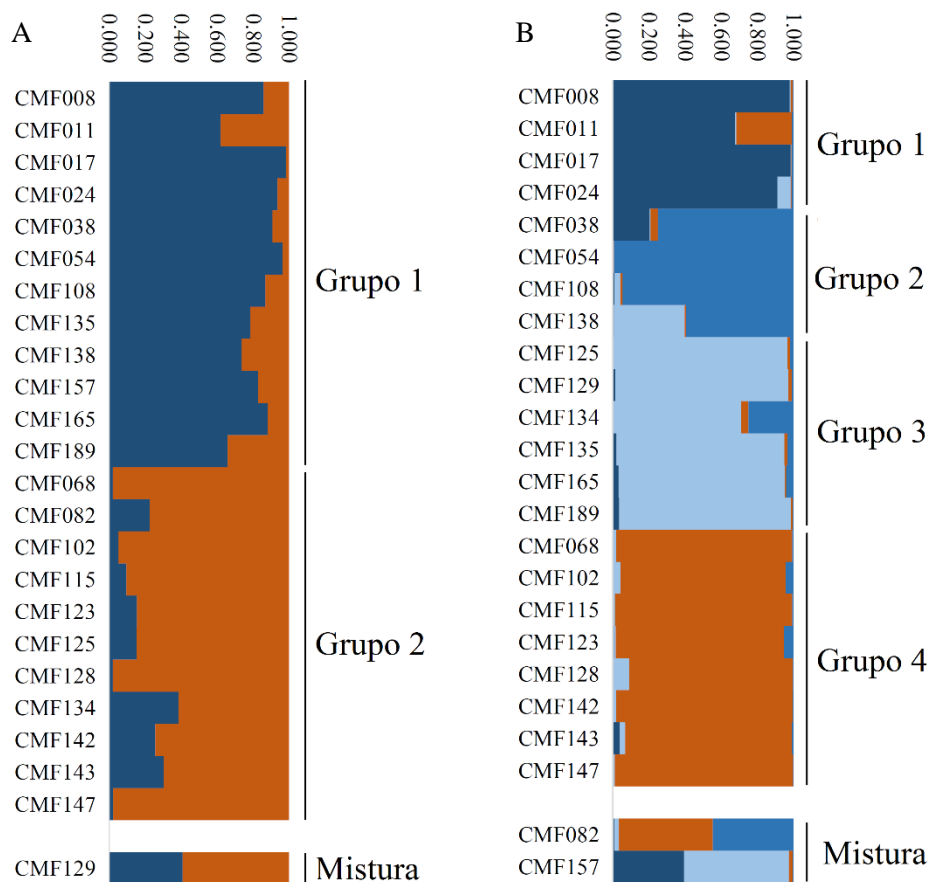
Considerando os dados de minissatélites com  $K=2$  (daqui em diante MiniK2) e uma probabilidade de atribuição mínima de 0,60 para definição dos acessos pertencentes a cada grupo, 12 acessos foram atribuídos ao Grupo 1

(CMF008, CMF011, CMF017, CMF024, CMF038, CMF054, CMF108, CMF135, CMF138, CMF157, CMF165 e CMF189), 11 acessos ao Grupo 2 (CMF068, CMF082, CMF102, CMF115, CMF123, CMF125, CMF128, CMF134, CMF142, CMF143 e CMF147) e um acesso (CMF129) foi alocado no grupo de mistura, cuja probabilidade de atribuição foi menor do que o critério estabelecido (Figura 6A).

De acordo com Matos et al. (2013) a análise da estrutura populacional de 96 acessos brasileiros de mamoeiro com base em 15 locos microssatélites indicou maior valor de  $\Delta K$  para seis grupos. Contudo, mesmo identificando o elevado grau de ancestralidade entre os diferentes grupos, revelando a presença de elevada mistura nestas populações, estes autores não estabeleceram uma probabilidade mínima de atribuição dos acessos aos diferentes grupos. Com isso, não é possível estabelecer comparações entre estes agrupamentos. Embora valores mínimos para alocação de acessos em grupos específicos sejam atribuídos de forma empírica, o valor de 0,60 tem sido utilizado com sucesso em algumas espécies de plantas, a exemplo do trigo (CHEN et al., 2012) e milho pipoca (SAAVEDRA et al., 2013).

Utilizando os dados de minissatélites, porém considerando a presença de quatro subpopulações (daqui em diante MiniK4), quatro acessos foram atribuídos ao Grupo 1 (CMF008, CMF011, CMF017 e CMF024), quatro acessos ao Grupo 2 (CMF038, CMF054, CMF108 e CMF138), seis acessos ao Grupo 3 (CMF125, CMF129, CMF134, CMF135, CMF165 e CMF189), oito acessos ao Grupo 4 (CMF068, CMF102, CMF115, CMF123, CMF128, CMF142, CMF143 e CMF147) e dois acessos (CMF082 e CMF157) alocados no grupo de mistura (Figura 6B). Com base nesta estrutura, acessos do Grupo1 (MiniK2) foram alocados nos Grupos 1 e 2 (MiniK4), enquanto que acessos do Grupo 2 (MiniK2) foram alocados no Grupo 4 (MiniK4). Por outro lado, o Grupo 3 (MiniK4) foi constituído por acessos dos Grupos 1 e 2 e da mistura (MiniK2). Além disso, considerando  $K=4$ , os acessos CMF157 e CMF082, anteriormente atribuídos aos Grupos 1 e 2 (MiniK2), respectivamente, formaram um grupo à parte de mistura, cuja maior probabilidade de atribuição foi de 0,58 e 0,52, para os acessos CMF157 e CMF082, respectivamente (Figura 6B).





**Figura 6.** Resultados da atribuição da análise de estrutura genética dos 24 acessos de germoplasma de mamoeiro, com base na análise dos marcadores minissatélites. Plotagem de barra do *Structure* v.2.3, assumindo A)  $K=2$  e B)  $K=4$ . Cada indivíduo é representado como uma linha vertical e é dividida em  $K$  segmentos coloridos, cujo comprimento é proporcional ao coeficiente individual de participação nos  $K$  clusters ou probabilidade de atribuição ( $q_k$ ) para cada cluster.

Para os microssatélites foram obtidas duas subpopulações (daqui em diante MicroK2), sendo o Grupo 1 formado por 14 acessos (CMF008, CMF011, CMF017, CMF024, CMF038, CMF054, CMF108, CMF123, CMF134, CMF135, CMF147, CMF157, CMF165 e CMF189) e o Grupo 2 formado por cinco acessos (CMF082, CMF102, CMF128, CMF138 e CMF142). Diferentemente dos minissatélites, um conjunto de cinco acessos (CMF068, CMF115, CMF125, CMF129 e CMF143) foi alocado no grupo de mistura (Figura 7A). Destes acessos, apenas o CMF129 é comum ao grupo de mistura dos minissatélites (MicroK2). Portanto, um maior número de acessos de mamoeiro não apresentou

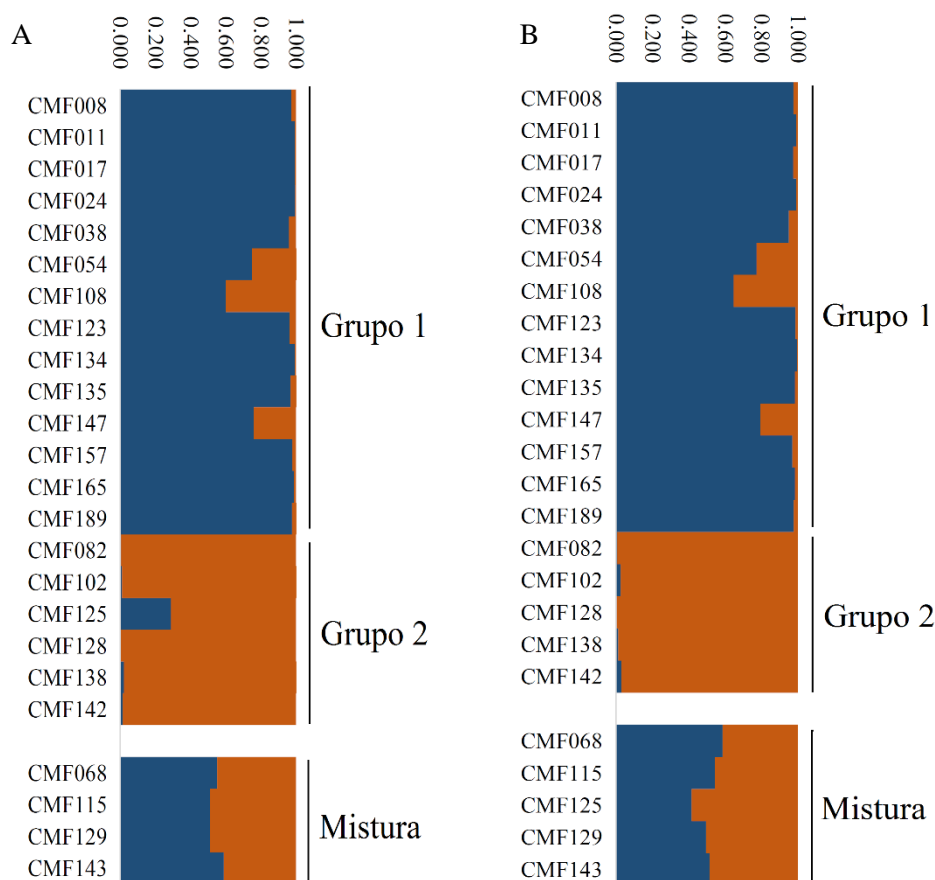
probabilidade de atribuição mínima para alocação em grupos específicos com uso dos marcadores microssatélites. O Grupo 1 do MicroK2 foi formado por um conjunto de acessos pertencentes aos Grupos 1 e 2 do MiniK2.

A análise conjunta dos marcadores mini e microssatélites ( $K=2$ ) revelou uma estrutura muito próxima à dos microssatélites isoladamente (Figura 7B). A única diferença observada refere-se à alocação do acesso CMF125 no grupo de mistura ao invés da sua alocação no Grupo 2 (Figura 7B). Considerando o desequilíbrio no número de marcadores mini e microssatélites (40 versus 91), é possível que o maior número de microssatélites tenha proporcionado uma maior contribuição para esta estrutura populacional, de modo a permanecer muito próxima àquela obtida somente com os marcadores microssatélites.

Em trabalho anterior sobre a estrutura genética em germoplasma, Matos et al. (2013) identificaram uma sobreposição entre os tipos de mamoeiro (Comum, Formosa e Solo), sugerindo uma origem comum ou a presença de alta deriva genética entre eles, considerando que a maioria dos 96 acessos avaliados apresentaram alelos comuns. Diferenças na representação destes alelos em nível individual e populacional (frequência alélica) podem resultar em diferentes agrupamentos dos acessos, conforme observado para os diferentes tipos de marcadores moleculares.

Considerando que a avaliação da diversidade genética e agrupamento utilizando marcadores moleculares é importante não só para os curadores de germoplasma, mas também para fins de melhoramento, o presente estudo documenta a eficácia comparativa de dois tipos de marcadores para o entendimento das relações genéticas mais usuais para uma gestão e conservação eficiente dos recursos genéticos da espécie. As principais diferenças na análise da estrutura populacional com base nos marcadores mini e microssatélites foram: 1) a presença de subestrutura ( $K=4$ ) para os minissatélites; 2) maior número de acessos com baixa probabilidade de atribuição para alocação em grupos específicos com uso dos microssatélites; 3) pequenas diferenças nos agrupamentos formados por ambos marcadores, em função das diferentes frequências alélicas. Por outro lado, o conhecimento da estrutura populacional presente no germoplasma de mamoeiro também é importante para futuros estudos de associação, onde a diversidade de marcadores é correlacionada com a variação fenotípica para características de interesse. Portanto, o uso conjunto

dos marcadores mini e microssatélites mais informativos pode contribuir para esta finalidade.



**Figura 7.** Resultados da atribuição da análise de estrutura genética dos 24 acessos de germoplasma de mamoeiro: A) com base na análise dos marcadores microssatélites e B) com base na análise conjunta dos marcadores minissatélites e microssatélites. Plotagem de barra do *Structure* v.2.3, assumindo  $K=2$ . Cada indivíduo é representado como uma linha vertical e é dividida em  $K$  segmentos coloridos, cujo comprimento é proporcional ao coeficiente individual de participação nos  $K$  clusters ou probabilidade de atribuição ( $q_k$ ) para cada cluster.

As análises da diversidade e estrutura genética de 27 variedades de amoreira com base em marcadores minissatélites (DAMD), *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) e RAPD demonstraram que as três técnicas permitiram a identificação de uma elevada amplitude nas distâncias genéticas, embora os marcadores minissatélites tenham demonstrado melhor ajuste entre as matrizes de distância genética e o agrupamento dos genótipos (BHATTACHARYA et al.,

2005). Adicionalmente, a análise da eficiência dos marcadores minissatélites, CAPS e microssatélites na distinção de genótipos bastante semelhantes com a cultivar de tomate San Marzano com base em dados fenotípicos, demonstrou que a correlação entre as distâncias genéticas dos marcadores minissatélites versus dados fenotípicos foi bastante elevada ( $r=0,98$ ) em comparação com os microssatélites ( $r=0,51$ ) (CARAMANTE et al., 2009).

## CONCLUSÃO

Os marcadores do tipo microssatélite se mostraram mais informativos quando comparado aos marcadores minissatélites. Porém, essa diferença pode estar relacionada ao número de locos utilizados de cada tipo de marcador e pode ser compensada pelo uso de um maior número de locos minissatélites. Além disso, os minissatélites estão sujeitos a um menor erro na genotipagem porque motivos maiores proporcionam um maior poder de detecção dos sistemas de genotipagem.

## REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.333-342, 2005.

ASUDI, G.O.; OMBWARA, F.K.; RIMBERIA, F.K.; NYENDE, A.B.; ATEKA, E.M.; WAMOCHO, L.S. Evaluating diversity among kenyan papaya germplasm using simple sequence repeat markers. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v.13, p.7307-7324, 2013.

BADILLO, V.M. Caricaceae Segundo esquema. **Revista de la Facultad de Agronomía - Universidad Central de Venezuela**, v.43, p.1-111, 1993.

BADILLO, V.M. *Carica* L vs *Vasconcella* St.-Hil. (Caricaceae), com la rehabilitación de este último. **Ernstia**, v.10, p.74-79, 2000.

BALLY, P.; GRANDAUBERT, J.; ROUXEL, T.; BALESSENT, M-H. FONZIE: An optimized pipeline for minisatellite marker discovery and primer design from large sequence data sets. **BMC Research Notes**, v.3, p.322, 2010.

- BHATTACHARYA, E.; DANDIN, S.B.; RANADE, S.A. Single primer amplification reaction methods reveal exotic and indigenous mulberry varieties are similarly diverse. **Journal of Bioscience**, v.30, p.669-677, 2005.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BROWN, J.E.; BAUMAN, J.M.; LAWRIE, J.F.; ROCHA, O.J.; MOORE, R.C. The structure of morphological and genetic diversity in natural populations of *Carica papaya* (Caricaceae) in Costa Rica. **Biotropica**, v.44, p.179-188, 2012.
- CARAMANTE, M.; RAO, R.; MONTI, L.M.; CORRADO, G. Discrimination of 'San Marzano' accessions: A comparison of minisatellite, CAPS and SSR markers in relation to morphological traits. **Scientia Horticulturae**, v.120, p.560-564, 2009.
- CARDOSO, P.C.B.; BRONDANI, C.; MENEZES, I.P.P.; VALDISSER, P.A.M.R.; BORBA, T.C.O.; DEL PELOSO, M.J.; VIANELLO, R.P. Discrimination of common bean cultivars using multiplexed microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.1964-1978, 2014.
- CHEN, C.; YU, Q.; HOU S.; LI, Y. J.; EUSTICE, M.; SKELTON, R. L.; VEATCH, O.; HERDES, R. E.; DIEBOLD, L.; SAW, J.; FENG, Y.; QIAN, W.; BYNUM, L.; WANG, L.; MOORE, P. H.; PAULL, R. E.; ALAM, M.; MING, R. Construction of a sequence-tagged high-density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in Brassicales. **Genetics**, v.177, p.2481-2491, 2007.
- CHEN, X.; MIN, D.; YASIR, T.A.; HU, Y-G. Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium in elite Chinese winter wheat investigated with SSR markers. **PLoS ONE**, v.7, p.e44510, 2012.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v.83, p.748-753, 1999.
- CRYER, N.C.; FENN, M.G.E.; TURNBULL, C.J.; WILKINSON, M.J. Allele size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.53, p.1643-1652, 2006.
- DIAS, N.L.P.; OLIVEIRA, E.J.; DANTAS, J.L.L. Avaliação de genótipos de mamoeiro com uso de descritores agronômicos e estimação de parâmetros genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.1471-1479, 2011.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- ECKERT, M.; GOUT, L.; ROUXEL, T.; BLAISE, F.; JEDRYCZKA, M.; FITT, B.; BALESSENT, M-H. Identification and characterization of polymorphic

minisatellites in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. **Current Genetics**, v.47, p.37-48, 2005.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.435-445, 2004.

EUSTICE, M.; YU, Q.; LAI, C.W.; HOU, S.; THIMMAPURAM, J.; LIU, L.; ALAM, M.; MOORE, P.H.; PRESTING, G.G.; MING R. Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya. **Tree Genetics & Genomes**, v.4, p.333-341, 2008.

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

FARIA, D.A.; MAMANI, E.M.C.; PAPPAS JR., G.J.; GRATTAPAGLIA, D. Genotyping systems for Eucalyptus based on tetra-, penta-, and hexanucleotide repeat EST microsatellites and their use for individual fingerprinting and assignment tests. **Tree Genetics & Genomes**, v.7, p.63-77. 2011.

FITCH, M.M.M. *Carica papaya* Papaya. In: LITZ, R.E. (Ed) **Biotechnology of fruit and nut crops**. Cambridge: CAB Publishing, p.174-207, 2005.

GARRETT, A. The pollination biology of papaw (*Carica papaya* L.) in Central Queensland. PhD Thesis, Central Queensland University, Rockhampton, 1995.

HEATH, D.D.; LWAMA, G.K.; DEVLIN, R.H. PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.5782-5785, 1993.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, E.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in Human DNA. **Nature**, v.314, p.67-73, 1985.

KARACA, M.; INCE, A.G. Minisatellites as DNA markers to classify bermudagrasses (*Cynodon* spp.): confirmation of minisatellite in amplified products. **Journal of Genetics**, v.87, p.83-86, 2008.

KIM, M.; MOORE, P.; ZEE, F.; FITCH, M.M.M.; STEIGER, D.; MANSCHARDT, R.; PAULL, R.; DREW, R.; SEKIOKA, T.; MING, R. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. **Genome**, v.45, p.503-512, 2002.

KIRST, M.; CORDEIRO, C.M.; REZENDE, G.D.; GRATTAPAGLIA, D. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **Journal of Heredity**, v.96, p.161-166, 2005.

LIU, K.; MUSE, S.V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, v.21, p.2128-2129, 2005.

MATOS, E.L.S.; OLIVEIRA, E.J.; JESUS, O.N.; DANTAS, J.L.L. Microsatellite markers of genetic diversity and population structure of *Carica papaya*. **Annals of Applied Biology**, v.163, p.298-310, 2013.

MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J.H.; SENIN, P.; WANG, W.; LY, B.V.; LEWIS, K.L.; SALZBERG, S.L.; FENG, L.; JONES, M.R.; SKELTON, R.L.; MURRAY, J.E.; CHEN, C.; QIAN, W.; SHEN, J.; DU, P.; EUSTICE, M.; TONG, E.; TANG, H.; LYONS, E.; PAULL, R.E.; MICHAEL, T.P.; WALL, K.; RICE, D.; ALBERT, H.; WANG, M.L.; ZHU, Y.J.; SCHATZ, M.; NAGARAJAN, N.; AGBAYANI, R.; GUAN, P.; BLAS, A.; WAI, C.M.; ACKERMAN, C.M.; REN, Y.; LIU, C.; WANG, J.; WANG, J.; NA, J.K.; SHAKIROV, E.V.; HAAS, B.; THIMMAPURAM, J.; NELSON, D.; WANG, X.; BOWERS, J.E.; GSCHWEND, A.R.; DELCHER, A.L.; SINGH, R.; SUZUKI, J.Y.; TRIPATHI, S.; NEUPANE, K.; WEI, H.; IRIKURA, B.; PAIDI, M.; JIANG, N.; ZHANG, W.; PRESTING, G.; WINDSOR, A.; NAVAJAS-PÉREZ, R.; TORRES, M.J.; FELTUS, ALEX, F.; PORTER, B.; LI, Y.; BURROUGHS, A.M.; LUO, M.C.; LIU, L.; CHRISTOPHER, D.A.; MOUNT, S.M.; MOORE, P.H.; SUGIMURA, T.; JIANG, J.; SCHULER, M.A.; FRIEDMAN, V.; MITCHELL-OLDS, T.; SHIPPEN, D.E.; DEPAMPHILIS, C.W.; PALMER, J.D.; FREELING, M.; PATERSON, A.H.; GONSALVES, D.; WANG, L.; ALAM, M. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). **Nature**, v.452, p.991-996, 2008.

NAKASONE, H.Y.; PAULL, R.E. **Tropical fruits**. CAB International, Wallingford, 1998.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, p. 3321-3323, 1973.

OCAMPO, J.; d'EECKENBRUGGE, G.C.; BRUYÈRE, S.; LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; OLLITRAULT, P. Organization of morphological and genetic diversity of Caribbean and Venezuelan papaya germplasm. **Fruits**, v.61, p.25-37, 2006.

OCAMPO PÉREZ, J.; d'EECKENBRUGGE, G.C.; RISTERUCCI, A.M.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P. Papaya genetic diversity assessed with microsatellite markers in germplasm from the Caribbean region. **Acta Horticulturae**, v.740, p.93-101, 2007.

OLIVEIRA, E.J.; AMORIM, V.B.O.; MATOS, E.L.S.; COSTA, J.L.; CASTELLEN, M.S.; PÁDUA, J.G.; DANTAS, J.L.L. Polymorphism of microsatellite markers in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, p. 519-530, 2010b.

OLIVEIRA, E.J.; COSTA, J.L.; SANTOS, L.F.; CARVALHO, F.M.; SILVA, A.S.; DANTAS, J.L.L. Molecular characterization of papaya genotypes using AFLP markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.848-858, 2011.

OLIVEIRA, E.J.; DANTAS, J.L.L.; CASTELLEN, M.S.; LIMA, D.S.; BARBOSA, H.S.; MOTTA, T.B.N. Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1747-1754, 2007.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, E.J.; SILVA, A.S.; CARVALHO, F.M.; SANTOS, L.F.; COSTA, J.L.; AMORIM, V.B.O.; DANTAS, J.L.L. Polymorphism microsatellite markers set for *Carica papaya* L and its use in molecular-assisted selection. **Euphytica**, v.173, p.279-287, 2010a.

OTTEWELL, K.M.; DONNELLAN, S.C.; MORAN, G.F.; PATON, D.C. Multiplexed microsatellite markers for the genetic analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and their utility for ecological and breeding studies in other *Eucalyptus* species. **Journal of Heredity**, v.96, p.445-451, 2005.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v.4, p.347-354, 1995.

PARASNIS, A.S.; RAMA KRISHNA, W.; CHOWDARI, K.Y.; GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P.K. (1999) Microsatellite (GATA)<sub>4</sub> reveals sex-specific differences in papaya. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.1047-1052, 1999.

PINTO, F.O.; PEREIRA, M.G.; LUZ, L.N.; CARDOZO, D.L.; RAMOS, H.C.; MACEDO, C.M. Use of microsatellite markers in molecular analysis of segregating populations of papaya (*Carica papaya* L.) derived from backcrossing. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.48-59, 2013.

POUWELS, D.; SIMONS, G. Fingerprinting microorganisms. **Food Technology**, v.57, p.36-40, 2003.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.

RODRIGUES, S.G.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, P.F.; COELHO, E.G.A.; ALVES, C.; VELLOSO, A.P.S.; PEREIRA, J.C.C. Microsatélites BM2113, ILSTS005, ILSTS008, ETH131 e RM 88 em testes de 96 verificações de parentesco para bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.309-313, 2002.

RUITBERG, C.M.; REEDER, D.J.; BUTLER, J.M. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.320-322, 2001.

SAAVEDRA, J.; SILVA, T.A.; MORA, F.; SCAPIM, C.A. Bayesian analysis of the genetic structure of a Brazilian popcorn germplasm using data from simple



sequence repeats (SSR). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.73, p.99-107, 2013.

SANTOS, S.C.; RUGGIERO, C.; SILVA, C.L.S.P.; LEMOS, E.G.M. A microsatellite library for *Carica papaya* L. cv. sunrise solo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.25, p.263-267, 2003.

SEEB, L.W.; ANTONOVICH, A.; BANKS, M.A.; BEACHAM, T.D.; BELLINGER, M.R.; BLANKENSHII, S.M.; CAMPBELL, M.R.; DECOVICH, N.A.; GARZA, J.C.; GUTHRIE III, C.M.; LUNDRIGAN, T.A.; MORAN, P.; NARUM, S.R.; STEPHENSON, J.J.; SUPERNAL, K.J.; TEEL, D.J.; TEMPLIN, W.D.; WENBURG, J.K.; YOUNG, S.F.; SMITH, C.T. Development of a standardized DNA database for Chinook salmon. **Fisheries**, v.32, p.540-552, 2007.

STILES, J. I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M. B.; MANSARDT, R. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.697-701, 1993.

VERGNAUD, G.; DENOEUDE, F. Minisatellites: mutability and genome architecture. **Genome Research**, v.10, p.899-907, 2000.

WAGNER, H.W.; SEFC, K.M. IDENTITY 4.0. Centre for Applied Genetics (University of Agricultural Sciences, Vienna, Austria), 1999. Disponível em: <http://www.uni-graz.at/~sefck/manual.pdf>.

WEEKS, D.E.; CONLEY, Y.P.; FERRELL, R.E.; MAH, T.S.; GORIN, M.B. A tale of two genotypes: Consistency between two high-throughput genotyping centers. **Genome Research**, v.12, p.430-435, 2002.

WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II**. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, 1996.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mamoeiro é uma fruteira de expressiva importância para o Brasil, um dos principais países produtores da fruta. Seu cultivo concentra-se em apenas duas variedades, conduzindo a cultura a uma estreita base genética.

Todavia, a sustentabilidade e expansão da cultura dependem do surgimento de novas variedades com características superiores para atender às exigências dos mercados interno e externo.

A caracterização e avaliação dos recursos genéticos existentes são de fundamental importância para o conhecimento da diversidade genética na cultura e ampliação da base genética mediante hibridação.

O uso de marcadores moleculares para caracterização do banco de germoplasma se torna interessante, uma vez que as informações moleculares não sofrem influência do ambiente e não alteram sua configuração durante o ciclo de vida da planta.

Marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*) já foram utilizados na análise da diversidade genética de mamoeiro. Porém, mesmo os microssatélites (SSR) que são marcadores codominantes e apresentam maior capacidade de revelar polimorfismos quando comparado a outros marcadores de DNA, ainda apresentaram baixa capacidade de geração de informações moleculares.

Os minissatélites ou locos VNTR (*'Variable Number of Tandem Repeats'*) são uma classe de marcadores moleculares pouco explorada, que possuem regiões dispersas no genoma, com sequências de 6 a 100 nucleotídeos repetidos em tandem, com um motivo comum de 10 a 15 pares de bases, apresentando alta capacidade de geração de polimorfismos.

Com o recente sequenciamento do genoma do mamoeiro e a consequente disponibilidade de sequências de DNA nos bancos de dados, foi possível traçar

estratégias como a mineração de sequências com repetições minissatélites por meio do programa *Tandem Repeats Finder* - TRF, o desenho de iniciadores utilizando o *software* Primer3 v.4.0 e sua utilização via PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

O uso de marcadores minissatélites na detecção de variabilidade genética entre 24 acessos de mamoeiro foi considerado satisfatório ao serem comparados com marcadores do tipo microsatélites, utilizando o mesmo conjunto de acessos.

Mesmo com o menor poder informativo observado nos marcadores do tipo minissatélites, esse tipo de marcador se mostrou promissor, sendo capaz de detectar alto nível de polimorfismo, com variações genéticas intraespecíficas em *C. papaya*, de forma otimizada e com baixo custo.

Vale ressaltar que foi utilizado um maior número de marcadores microsatélites no trabalho de caracterização dos acessos e que estes foram oriundos de trabalhos prévios que demonstraram o potencial destes marcadores na identificação de polimorfismo do mamoeiro. Sendo assim, a inferioridade observada nas análises com minissatélites pode ser compensada pelo uso de um maior número de locos.

Contudo, espera-se que os marcadores do tipo minissatélites possam contribuir para aumentar o nível de detecção de polimorfismo molecular dentro e entre acessos de mamoeiro, representando assim uma importante ferramenta para análises genética da espécie.