INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GERMOPLASMA de *Mangifera indica* E DO PATÓGENO *Ceratocystis fimbriata*

SIMONE RIZATTO

Orientador: Maria Imaculada Zucchi

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia

Campinas, SP
Abril, 2010

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

R627c Rizatto, Simone
Caracterização molecular do germoplasma de *Mangifera indica* e do patógeno *Ceratocystis fimbriata* / Simone Rizatto.
Campinas, 2010. 66 fls.

Orientadora: Maria Imaculada Zucchi
Dissertação (Mestrado em Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia)– Instituto Agronômico

1. Manga – diversidade genética 2.Marcadores ISSRs I. Marcadores SRs 3. Seca da mangueira I. Zucchi, Maria Imaculada II. Título

CDD. 633.44

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(019) 3231-5422 ramal 194
pgiac@iac.sp.gov.br

INSTITUTO AGRONÔMICO

Curso de Pós-Graduação

Agricultura Tropical e Subtropical

Certificado de Aprovação

Título: **Caracterização molecular do germoplasma de *Mangifera indica* e do patógeno *Ceratocystis fimbriata***

Aluna: **Simone Rizatto**

Área de Concentração: **Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia**

Processo SAA nº: **12187/08**

Orientadora: **Dra. Maria Imaculada Zucchi**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dra. Maria Imaculada Zucchi - IAC

Dra. Regina Helena Geribello Priolli - ESALQ

Dr. Alisson Fernando Chiorato - IAC

Campinas, 19 de abril de 2010

Visto:

Adriana Parada Dias da Silveira
Coordenadora
Pós-Graduação Instituto Agronômico

Ao meu pai

JP,

DEDICO

À minha mãe

Vilma,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Á pesquisadora e orientadora Dra. Maria Imaculada Zucchi, pela confiança, ensinamentos, pelo auxílio e atenção dispensada durante a realização deste trabalho.

- Ao pesquisador e co-orientador Dr. José Baldin Pinheiro pela confiança e oportunidade importantes no curso e na minha vida profissional.

- Ao pesquisador Dr. Carlos Jorge Rossetto por toda atenção e informação que sem elas esse trabalho não poderia ser realizado.

- Aos professores da Área de Concentração em Melhoramento Vegetal da PG-IAC, pelo incentivo e pelos conselhos e ensinamentos constantes transmitidos;

- Aos funcionários da PG-IAC, pelo auxílio e atenção no decorrer do curso;

- A todos os colegas da pós-graduação, cujos nomes não citarei, porque graças a Deus são muitos;

- A todas as meninas da republica que foram muito importantes para mim e me agüentaram por todo esse tempo;

- A FAPESP, por financiar a execução desse projeto;

- Ao meu pai por todo suporte financeiro, por acreditar na minha capacidade e por me incentivar a concluir este trabalho, pelo carinho, amor e atenção;

- A minha mãe pela paciência, dedicação, compartilhando comigo todos os momentos alegres e difíceis no decorrer do curso, pelo carinho, amor e atenção;

- A minha irmã, simplesmente por existir em minha vida;

- A todos do laboratório de Diversidade genética e melhoramento da ESALQ;

- A todos que colaboraram para a realização e finalização deste trabalho;

- A Deus por todas as bênçãos recebidas e por estar sempre guiando minha vida e iluminando meu caminho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LSTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. – *Mangifera Indica*	03
2.2. – *Ceratocystis Fimbriata*	07
2.3. – Marcadores Moleculares	09
2.3.1. – Marcadores Microssatélites	14
2.3.2. – Marcadores ISSR's	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Material vegetal - *Mangifera Indica*	18
3.1.2. Extração e Quantificação de DNA	19
3.1.3. Caracterização de Marcadores Microssatélites	21
3.1.4. Caracterização de Marcadores ISSR's	23
3.1.5. Metodologia de análise estatística dos dados de Marcadores Microssatélites	24
3.1.6. Metodologia de análise estatística dos dados de Marcadores ISSR's	25
3.2. Material microbiológico - *Ceratocystis Fimbriata*	25
3.2.1. Extração e Quantificação de DNA	26
3.2.2. Desenvolvimento de bibliotecas	26
3.2.3. Seleção e seqüenciamento dos clones	29
3.2.4. Avaliação do polimorfismo	32
3.2.5. Caracterização de Marcadores Microssatélites	32
3.2.6. Metodologia de análise estatística dos dados	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Material Vegetal - *Mangifera Indica*	34
4.1.1. Marcadores Microssatélites	34
4.1.2. Utilização de *Primers* Microssatélites	35
4.1.3. Caracterização da Variação Genética utilizando Marcadores SSR's	38
4.1.4. Estrutura Genética utilizando Marcadores SSR's	38
4.1.5. Marcadores ISSR's	38
4.1.6. Utilização de *Primers* ISSR's	38
4.1.7. Estrutura Genética utilizando Marcadores ISSR's	39
4.2. Material microbiológico - *Ceratocystis Fimbriata*	44
4.2.1. Desenvolvimento de Bibliotecas Enriquecidas com Locos Microssatélites	44
4.2.1.1. Análise das Seqüências	44
4.2.1.2. Desenvolvimento de *Primers*	44
4.2.1.3. Utilização de *Primers*	46
4.2.2. Caracterização da Variação Genética	47
4.2.3. Estrutura Genética	50
5. DISCUSSÃO	51
5.1. *Mangifera indica*	51
5.1.1. Marcadores SSRs	51
5.1.2. Marcadores ISSRs	53
5.2.*Ceratocystis fimbriata*	55
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Relação de *Mangifera indica* do BAG de Votuporanga. 18

Tabela 02 - *Primers* microssatélites sintetizados, com seus respectivos motivos, temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação esperado dos acessos (pb) de acordo com DUVAL et al. (2005) e CHITOSE HONSHO et al. (2005). 21

Tabela 03 - Reação de PCR para os diferentes *primers* de SSRs. 23

Tabela 04 - *Primers* ISSRs sintetizados, com seus respectivos motivos, temperatura de anelamento e tamanho (pb). 23

Tabela 05 - Reação de PCR para os diferentes *primers* de ISSR . 24

Tabela 06 - Locais de coleta de ramos de mangueira infectados com *C. fimbriata.* 26

Tabela 07 - Listagem dos 84 indivíduos utilizados na genotipagem para os marcadores SSRs. 34

Tabela 08 - Seqüências dos pares de *primers* de *M. indica* que amplificaram 23 locos microssatélites, em 84 acessos de *M. indica*, com seus respectivos motivos, amplitudes alélicas, número de alelos, heterozigosidades observadas e esperadas, temperatura de anelamento, P valor (EHW) e número de acessos do Genbank. 36

Tabela 09 - Listagem dos 65 indivíduos utilizados na genotipagem para os marcadores ISSRs. 42

Tabela 10 - Seqüências dos pares de *primers* de *M. indica* que amplificaram 12 locos ISSRs, em 84 acessos de *M. indica*, com suas respectivas bandas polimórficas e número total de bandas. 42

Tabela 11 - *Primers* construídos a partir das seqüências microssatélites. 45

Tabela 12 - Seqüências dos pares de *primers* desenvolvidos para *C. fimbriata* que amplificaram 20 locos microssatélites, em 13 acessos de *C. fimbriata*, com seus respectivos motivos, amplitudes alélicas, número de alelos, heterozigosidades observadas e esperadas, temperatura de anelamento, conteúdo do índice de polimorfismo, P valor (EHW) e número de acessos do Genbank. 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - a) Fruto de origem filipínica. 04
b) Raiz poliembriônica do fruto da raça filipínica. 04

Figura 02 - a) Fruto de origem indiana. 04
b) Raiz monoembriônica do fruto da raça indiana. 04

Figura 03 - Principais países produtores de Manga no ano de 2002 (segundo dados da FAO http:// apps.fao.org). 05

Figura 04 - a) Seca da copa de mangueiras. 09
b) Lesão em tronco de mangueira provocado pelo fungo *C. fimbriata.* 09

Figura 05 - Dendograma baseado na matriz de distância genética de Rogers-W obtido para as 84 amostras do banco de germoplasma da APTA / Votuporanga de *M. indica*. Na vertical estão as amostras e na horizontal o nível de similaridade. As porcentagens junto aos nós representam sua estabilidade, testada através de 10000 reamostragens *bootstraps.* 40

Figura 06 - Arranjo das amostras em 3 grupos (K=3) realizado pelo programa STRUCTURE utilizando o marcador microssatélite. Na horizontal estão apresentados os acessos de *M. indica*, e na vertical o nível de estruturação. As amostras com a mesma cor pertencem ao mesmo grupo. 41

Figura 07 - Arranjo das amostras em 3 grupos (K=3) realizado pelo programa STRUCTURE utilizando o marcador ISSR. Na horizontal estão apresentados os acessos de *M. indica*, e na vertical o nível de estruturação. As amostras com a mesma cor pertencem ao mesmo grupo. 41

Figura 08 - Dendograma baseado no índice de similaridade de Jaccard obtido para as 65 amostras do banco de germoplasma da APTA / Votuporanga de *M. indica*. Na vertical estão as amostras e na horizontal o nível de similaridade. As porcentagens junto aos nós representam sua estabilidade, testada através de 10000 reamostragens *bootstraps.* 43

Figura 09 - Perfil de gel de ISSRs, utilizando o *primer* 18 de 14 genótipos de *M. indica.* 43

Figura 10 - Freqüências de motivos microssatélites perfeitos, compostos e compostos interrompidos de *C. fimbriata.* 46

Figura 11 - Motivos microssatélites mais freqüentes em *C. fimbriata.* 46

Figura 12 - Perfil de gel de microssatélites, utilizando o *primer* C.fim 02 de 12 genótipos de *C. fimbrita.* 47

Figura 13 - Padrão de divergência genética entre 13 isolados de *C. fimbriata*, definido pelo agrupamento UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Rogers-W (1978). 50

Figura 14 - Arranjo das amostras em 2 grupos (K=2) realizado pelo programa STRUCTURE utilizando o marcador SSR. Na horizontal estão apresentados os acessos de *C. fimbriata*, e na vertical o nível de estruturação. As amostras com a mesma cor pertencem ao mesmo grupo. 50

LISTA DE ANEXOS

Anexo 01 - Matriz de distância genética de marcadores SSR para *C. fimbriata*. 65

Anexo 02 - Matriz de distância genética de marcadores SSR para *M. indica.* 66

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GERMOPLASMA de *Mangifera indica* E DO PATÓGENO *Ceratocystis fimbriata*

RESUMO

A manga é a fruta tropical mais aceita no mercado consumidor, não só pelas suas qualidades degustativas, mas também pelo seu alto valor nutricional. Em nível mundial a manga é um dos mais importantes e reconhecidos frutos na economia de regiões tropicais e subtropicais. Dados estatísticos da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) indicaram que em 2001 a produção mundial foi superior a 25 milhões de toneladas de manga, colocando esta fruta com uma produção à frente das frutas cítricas, bananas, uvas e maçãs. Entre as principais doenças da espécie está a seca-da-mangueira causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata*. Esta doença vem provocando severos prejuízos à cultura, pois provoca a seca da mangueira. Ela é conhecida no Brasil desde 1938 em Recife-PE e 1942 em São Paulo. Dessa forma, a diversidade genética de mangueira do banco de germoplasma da APTA / Votuporanga foi avaliada utilizando-se marcadores SSRs e ISSRs. Além disso, também avaliou-se a diversidade genética de isolados do patógeno por meio de marcadores SSRs obtidos da construção da biblioteca genômica enriquecida com marcadores SSRs. Para tanto, foi extraído DNA tanto do material vegetal dos acessos de mangueira, como dos isolados do fungo, utilizando o protocolo de CTAB. A diversidade dos acessos de mangueira foi estimada por meio de 15 primers ISSRs onde somente 12 foram polimórficos e o índice de similaridade entre os acessos, variou de 0,0689655 a 0,8780488. O Structure agrupou os acessos em três grupos. Nos acessos de mangueira, para os microssatélites, foram utilizados 34 primers, onde somente 23 foram polimórficos e as distâncias variaram entre os acessos, de 0,2887 a 0,8660. O agrupamento pelo Structure coincidiu com o marcador ISSR, agrupando os acessos nos mesmo três grupos. Nos isolados do fungo foram desenhados 22 primers onde 20 foram polimórficos. Para os isolados as distâncias de Rogers-W variaram de 0,3441 a 0,7609 e o Structure agrupou os isolados em dois grupos. Nos acessos de mangueira, observamos a alta variabilidade do banco de germoplasma e o alto grau de polimorfismo dos primers utilizados, confirmado com os dois tipos de marcadores utilizados. Os resultados obtidos forneceram informações importantes para a identificação e conservação da variabilidade genética do germoplasma de mangueira.

Palavras – Chave: Diversidade genética, marcadores ISSRs, marcadores SSRs, seca da mangueira.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MANGO (*Mangifera indica*) GERMPLASM AND OF ITS PATHOGEN *Ceratocystis fimbriata*

ABSTRACT

Mango (*Mangifera indica*) is one of the worlds' most consumed tropical fruit, not only for its table quality but also for its high nutritional content. It is one of the most economically important agricultural products of the tropics and subtropics. In the year of 2001, the world's production of mango was superior to 25 millions of tons (FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations), i.e., superior to the production of citrus, bananas, grapes and apples. This culture is severely attacked by the fungus *Ceratocystis fimbriata*, which causes a disease known as mango wilt, leading to serious loss of yield. This disease is known in Brazil since 1983 (Pernambuco) and 1942 (São Paulo). The genetic diversity of the mango germplasm of APATA / Votuporanga was evaluated through SSR and ISSR markers. DNA from mango accessions was extracted through the CTAB protocol. We used 15 ISSR primers (12 polymorphic). The Similarity Index varied from 0.0689655 to 0.8780488, and the accessions were grouped in three clusters according to the Bayesian analysis made by STRUCTURE. We also used 34 SSR primer pairs (23 polymorphic). Genetic distances among accessions varied from 0.2887 to 0.8660, and results of STRUCTURE analysis were very similar to those obtained for the ISSR markers. We detected high genetic diversity within the germplasm bank. In addition to the study of mango germplasm diversity, we developed SSR-enriched libraries of *C. fimbriata* for subsequent primers design and genetic diversity analysis of fungal isolates. We designed 22 primer pairs, and 20 showed to be polymorphic. The distances of Rogers-W among isolates varied from 0.3441 to 0.7609 and the isolates were clustered in two groups by STRUCTURE. Results obtained provide important information and tools for the identification and conservation of the genetic variability of the mango germplasm, and also may help in the identification of the fungal isolates' geographic distribution. Combined, our results may be useful for the selection of mango genotypes resistant to *Ceratocystis fimbriata.*

Keywords: Genetic diversity, ISSR markers, SSR markers, mango wilt.

1. INTRODUÇÃO

A mangueira pertencente ao gênero *Mangifera*, é a frutífera tropical mais aceita no mercado consumidor, não só pelas suas qualidades degustativas, mas, pelo seu alto valor nutricional (DONADIO & FERREIRA 2002). A mangueira pertencente ao *Phylum* Angiospermae, *Subphylum* Dicotiledones, Divisão Lignosae, Ordem Sapindales e Família Anacardeaceae. Tem um total de 70 espécies muitas das quais são encontradas no Sudeste da Ásia (Indochina, Tailândia e Malásia) sendo distinguíveis entre si pelo número de estames viáveis (não estaminóides). Muitas fruteiras da família Anacardiaceae são de espécies afins da mangueira como o caju (*Anacardium occidentale* L.), o pistache (*Pistachio vera* L.) e as diversas frutas comestíveis do gênero *Spondias* tais como a seriguela (*S. mombin* L.), o umbu (*S. tuberosa* L.), a cajá-manga (*S. cytherea* Senn.) entre outras.

A mangueira é conhecida há mais de quatro mil anos e originou-se no Centro de Origem que se divide em dois Sub-Centros: o Indico-Burma-Tailandês e o Filipínico-Celeste/Timor. Estes dois sub-centros deram origem às duas raças de mangas hoje conhecidas pelos estudiosos da mangicultura: a raça indiana que possui flores com um estame viável, frutos de formato oblongo ovalado com sementes monoembriônicas e, em geral, com casca variando de rósea a vermelha e a raça filipínica ou indochinesa cujos frutos tem formato longo com sementes poliembriônicas e casca variando de verde a amarela (MUKHERJEE, 1985).

Comerciantes espalharam o cultivo do centro de origem e domesticação para outras regiões tropicais e subtropicais. Portugueses introduziram no oeste e no leste da África e também no Brasil. Provavelmente, foi levada para as ilhas do Caribe, de onde os espanhóis introduziram no México, e foi introduzida na Flórida, nos EUA, inicialmente a partir do Caribe e posteriormente com material proveniente da Índia (VIRUEL et al., 2005).

A grande responsabilidade do melhorista de manga é aumentar a disponibilidade de cultivares superiores, diminuindo a vulnerabilidade hoje existente nos cultivos monoclonais que podem ser destruídos totalmente pelo ataque de pragas (fungos ou insetos). Dentre essas, os principais são: o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causando antracnose, o fungo *Oidium mangiferae* produzindo conídios que irão infectar folhas, flores e frutos e o fungo *Ceratocystis fimbriata* causando a seca da mangueira.

Entre as principais doenças da espécie, a seca da mangueira causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* provoca severos prejuízos a cultura (ROSSETTO & RIBEIRO, 1990). Ela é conhecida no Brasil desde 1938 em Recife-PE e 1942 em São Paulo. O fungo pode infectar as raízes da mangueira causando a seca das raízes (nesse caso, o controle deve ser feito com a utilização de porta-enxerto resistente ao fungo) e pode também infectar a copa da mangueira (nesse caso tem sido observada enorme variação de suscetibilidade entre variedades de mangueira) (ROSSETTO et al., 1996).

A seca da mangueira sempre foi uma doença de ocorrência restrita ao Brasil e recentemente essa doença foi constatada no Paquistão e no Sultanato de Oman, indicando a grande variabilidade genética deste fungo (VAN WYK et al., 2005; AL-SUBHI et al., 2006). O fungo no Sultanato de Oman foi identificado como *Ceratocystis omanensis,* uma espécie diferente da relatada no Brasil. Há, todavia, grande possibilidade dessa espécie introduzida em Oman ter origem brasileira. É bem provável que existam mais espécies de *Ceratocystis* não relatadas, infectando mangueiras, além de outras espécies vegetais, no Brasil.

Como os marcadores possibilitam a quantificação da similaridade genética entre genótipos e, conseqüentemente, a estruturação da diversidade genética, seu uso torna possível organizar grupos de indivíduos de acordo com padrões de similaridade. Assim, no caso de bancos de germoplasma, são empregados na avaliação da diversidade genética existente entre os acessos e também na construção de coleções nucleares (SOUZA, 2001).

O estudo da diversidade genética do germoplasma de mangueira no Brasil utilizando marcadores microssatélites e ISSRs são inéditos. Considera-se que as informações a serem obtidas fornecerão subsídios para a identificação, exploração e conservação da variabilidade genética dessa espécie. O desenvolvimento de marcadores microssatélites para o patógeno permitirá também uma caracterização de isolados dessa importante doença da cultura. Desta forma, informações serão geradas para orientar nos programas de melhoramento. É sabido que não existe, no caso desta espécie de fungo, uma correlação entre a taxonomia morfológica e a patogenicidade. Porém, uma caracterização molecular permitirá mapear as áreas de ocorrência de cada isolado para fins de seleção.

O germoplasma de manga disponível no Brasil atualmente é pouco caracterizado quanto a sua diversidade genética. Poucos trabalhos foram realizados utilizando marcadores moleculares. Desta forma, os objetivos principais deste trabalho são: a) caracterizar a diversidade genética molecular do germoplasma brasileiro de manga com marcadores

microssatélites e marcadores ISSRs e b) desenvolver bibliotecas enriquecida com microssatélites para o importante patógeno da cultura *Ceratocystis fimbriata*.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Para *Mangifera indica*, utilizar marcadores SSRs e ISSRs para: a) calculo da variabilidade genética entre cultivares de manga do BAG de Votuporanga b) observar se o BAG pode ser dividido ou agrupado em diferentes grupos.
- Para *Ceratocystis fimbriata*: a) utilizar um método eficiente de enriquecimento para isolar e seqüenciar locos que contenham regiões microssatélites do fungo; b) desenhar *primers* específicos visando à amplificação dos locos microssatélites isolados e selecionados; c) caracterizar cada loco de microssatélite isolado com relação á variabilidade genética; d) observar se os isolados podem ser divididos ou agrupado ou diferenciado em diferentes grupos; e) disponibilizar informações de um estudo preliminar de caracterização e estrutura genética populacional do fungo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – *Mangifera Indica*

A manga é uma das mais importantes frutas tropicais e sua história é descrita nos mais antigos sânscritos da mitologia Hindu; acredita-se que a mangueira é cultivada há mais de quatro mil anos (MUKHERJEE, 1953).

É provável que o cultivo da mangueira tenha se iniciado na Índia, onde mais de mil variedades já foram encontradas, resultantes de seleções dentro de populações de cruzamento ao acaso (PINTO et al., 2005).

A manga foi introduzida no Brasil no século XVI, dando origem, através de sementes, a diversas variedades cultivadas (SUBRAMANYAM et al., 1975). As introduções que pertenciam às mangas da raça Filipinica geralmente fibrosas e poliembriônicas, apresentaram limitada variação genética (Figura 01). As variedades da raça Indiana são monoembriônicas e portadoras de melhor qualidade, apresentaram grande variabilidade quando plantadas de pé franco (Figura 02).

a) b)

Figura 01: a) Fruto de origem filipínica; b) Raiz poliembriônica do fruto da raça filipínica

a) b)

Figura 02: a) Fruto de origem indiana; b) Raiz monoembriônica do fruto da raça indiana

A dominância da raça Filipinica no Brasil por três séculos limitou a expansão da cultura, porém a introdução de cultivares da raça Indiana procedentes da Flórida, EUA, na década de 60 deu um novo alento à cultura organizada da manga, pois seus frutos com pouca fibra, bem coloridos e mais resistentes à antracnose, são mais comercializáveis. Com o advento das variedades americanas a cultura tomou um grande impulso do ponto de vista comercial, conquistando inicialmente um bom mercado interno e mais recentemente o mercado externo, principalmente dos Estados Unidos e Europa.

A manga dispersou-se por todos os continentes sendo cultivada, atualmente, na maioria dos países de clima tropical e subtropical (Figura 03). É considerada originária da região Sudo-Burma (SINGH, 1967), onde predomina principalmente o clima monçônico, que se caracteriza por duas estações bem distintas, uma chuvosa e outra seca (CAMARGO et al., 1977).

A manga pertence ao grupo de plantas tolerantes à seca, mas pode resistir a curtos períodos de cheia (SCHAFFER & ANDERSEN, 1994). Temperaturas máximas acima de 35° causam injúrias nas plantas, já temperaturas de 8 a 10°C durante o período frio do ano podem

ser consideradas como o limite inferior para o sucesso na produção de manga (CAMPBELL, 1994).

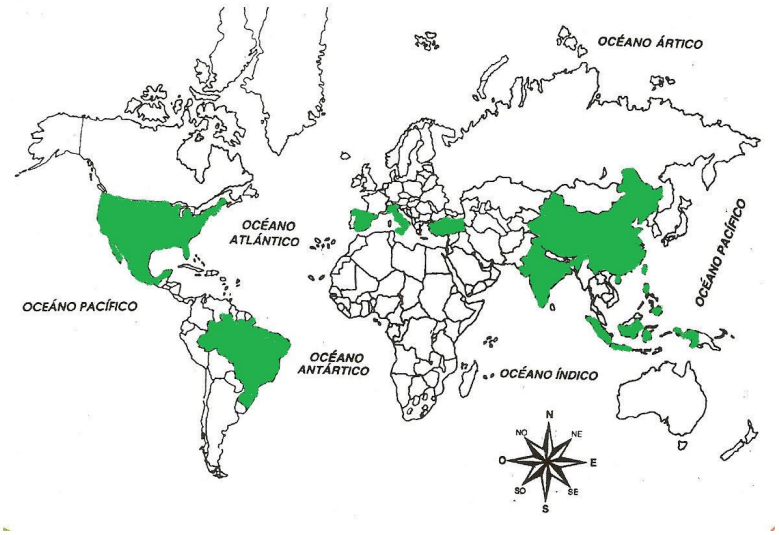

Figura 03: Principais países produtores de Manga no ano de 2002 (segundo dados da FAO http://apps.fao.org).

A cultura exige, para produzir maiores safras e melhores frutos, a existência de uma estação seca bem definida (BRUNINI & ALFONSI, 1980). Essa estação é necessária para que a planta entre em dormência temporária, com isto ocorre diminuição do crescimento vegetativo e, como conseqüência, o aumento da produção de flores e frutos. A mangueira cultivada sob baixa precipitação (1.000 a 1.500 mm) necessita de irrigação para produzir bem, já em alta precipitação (1.900 a 2.500 mm) necessita de um eficiente sistema de drenagem (CASTRO & KLUGE, 1998).

Em virtude das condições climáticas favoráveis à colheita de manga de melhor qualidade, há um crescente aumento na área plantada com manga no Nordeste, o que permitirá esta região assumir a liderança nacional na produção desta fruta.

De acordo com ALMEIDA et al. (2005), a mangicultura é uma das principais atividades do agronegócio frutícola do Brasil, apresentando desempenho crescente nos últimos anos. A demanda mundial por frutas vem crescendo expressivamente, entretanto a magnitude das perdas pós-colheita preocupa, sendo mais expressivas nas regiões tropicais, devido às condições ambientais favoráveis, que permite o desenvolvimento de pragas e doenças (OLIVEIRA et al., 2006).

Embora a produção de 456 mil toneladas (FAO, 1998), coloque o Brasil no oitavo lugar entre os maiores produtores mundiais, esta produção - em grande parte de plantios

extensivos não comerciais com elevadas perdas pós-colheita - somente atenderia a demanda interna brasileira, considerando um consumo no Nordeste (Fortaleza) de 2,4 kg de manga per capita/ano (IBGE, 1998).

A área de manga colhida no Brasil é de 57,1 mil ha. estando a maior concentração nas regiões Sudeste e Nordeste e nessas regiões os principais estados produtores de manga são: São Paulo (23%), Bahia (22%), Pernambuco (11%), Minas Gerais (10%), Ceará (7%) e Piauí (4%) (SOUZA et al., 2002).

A exportação da fruta teve crescimento significativo e verifica-se que no período de 1981 a 2001 houve um aumento de 93.666 toneladas, sendo a região nordeste representante de 88% dessa exportação. A América do Norte e a Comunidade Européia são os principais importadores da fruta que ainda é usada em sua maior parte em consumo *in natura* (SOUZA et al., 2002).

Esse acelerado crescimento deu-se com o surgimento de novas cultivares vindas da Flórida (EUA), as quais ganharam notoriedade, importância econômica, social e conseqüentemente, boa aceitação pelos fruticultores e consumidores. Juntamente com a exportação, veio também a migração da população do campo para a cidade trazendo produtos que antes só eram consumidos na zona rural.

Atualmente encontra-se com certa facilidade grande variabilidade de manga no mercado consumidor, isso é função do grande número de cultivares, diversidade das regiões produtoras, plantios tecnificados e à aplicação da indução floral. As safras podem variar de novembro a março na região sudeste e de agosto a novembro na região nordeste (COUTO et al., 1996). Existem ainda muitas controvérsias, na determinação do momento exato da colheita. De acordo com MANICA (1981), esta seria observada empiricamente pela mudança de cor da casca, época do ano ou através da determinação do conteúdo ácido e de açúcar dos frutos.

BLEINROTH (1988) descreve a densidade como um fator consistente, na determinação do ponto de colheita. Outros autores ainda asseguram que um dos melhores parâmetros de maturação seria a firmeza da polpa, que começa a diminuir no ponto de colheita. Porém, os métodos visuais são os mais utilizados pelos produtores, baseando-se na mudança de coloração da casca, tamanho e formato do fruto, que geralmente passa de arredondado para elíptico.

Embora a mangueira seja a quinta mais importante espécie frutífera do mundo, os melhoristas têm uma pequena variabilidade genética à sua disposição para uso no

melhoramento, já que a manutenção de um banco de germoplasma é muito cara. Muitas das espécies de *Mangifera* com características genéticas importantes ocorrem em florestas tropicais do Sudeste Asiático as quais têm sido destruídas para exploração de madeira ocorrendo assim uma verdadeira erosão genética de muitas das espécies (PINTO et al., 2005).

No Brasil o cultivo de manga, que era feito nos anos 50 de pé franco, hoje está totalmente reformulado. Todos os atuais plantios são feitos com plantas enxertadas, e os portas-enxerto recomendados, têm sido quase sempre os de Espada ou Espadinha ou também chamado, comum ou Coco ou Coquinho (SIMÃO, 1980).

Nos plantios comerciais da manga, tanto para o mercado interno como para o externo, a cultivar Tommy Atkins é a que tem maior importância comercial, é a mais cultivada e exportada no País por ter boa produtividade, boa capacidade de adaptação a diferentes ambientes de cultivo, maior tolerância a certas doenças, como o oídio, a antracnose e a verrugose, além de apresentar frutos com qualidade razoável e boa conservação pós-colheita. Em seguida, vêm as cultivares Haden, Keitt, Palmer e Van Dyke. A 'Tommy Atkins', 'Haden' e 'Keitt' constituem cerca de 92% da área plantada no Vale do Rio São Francisco (BRASIL, 1999).

Em nível mundial a manga é um dos mais importantes e reconhecidos frutos na economia de regiões tropicais e subtropicais. Verificou-se em 2001 que a produção mundial foi superior a 25 milhões de toneladas de manga, colocando esta fruta com uma produção à frente as frutas cítricas, bananas, uvas e maçãs (FAO, 2002).

2.2 – *Ceratocystis fimbriata*

Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted é causador de doenças em muitas plantas lenhosas e em algumas herbáceas de importância econômica como, por exemplo, mangueira (*Mangifera indica* L.), acácia negra (*Acácia mearnsii* De Wild), batata doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam], cacau (*Theobroma cacao* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), citrus (*Citrus* spp.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), figo (*Ficus carica* L.), gmelina (*Gmelina arborea* Roxb) e seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell & Arg]. (BAKER et al., 2004).

O primeiro relato da ocorrência do patógeno no Brasil foi em 1935 por COSTA, A. S. e KLUNG, H. Em 1938 foi feito o primeiro relato de sintomas em Pernambuco por

PYENSON, L. e em 1940 a doença chega ao estado de São Paulo e foi relatado por ARRUDA, S. C.

Inicialmente foi identificado como *Diplodia recifensis* em 1947 por BATISTA, A. C. como doença causadora do Mal de Recife onde infectou e dizimou plantações de mangueira. A primeira identificação como *Ceratocystis fimbriata* foi por SILVA, J. N. em 1959 segundo boletim técnico nº 7 do Instituto Agronômico do Nordeste, Recife – Pernambuco, Brasil 38p.

Na década de 90 a doença denominada "seca da mangueira" torna-se um sério problema fitossanitário internacional da mangueira. A primeira ocorrência da doença no Paquistão, foi em 1998 relatada por MALIK, M. T. et al. e a primeira ocorrência da doença no Sultanato de Oman também foi em 1998 e foi relatada por AL-SUBHI, et al. O fungo no Sultanato de Oman foi identificado como *Ceratocystis omanensis,* uma espécie diferente da relatada no Brasil. Há, todavia, grande possibilidade dessa espécie introduzida em Oman ter origem brasileira.

É um fungo oportunista que pode causar sérios danos à mangueira se as condições forem estressantes para a planta. Em planta lenhosa, *C. fimbriata* é um típico patógeno de xilema (BAKER & HARRINGTON, 2004) que penetra na planta por ferimentos. Tais ferimentos podem ser provocados por insetos, ventos, granizo e práticas silviculturais. Os ferimentos que ocorrem nos meses quentes e chuvosos são mais favoráveis para infecção do que os ferimentos que ocorrem nos meses frios e secos.

A seca-da-mangueira da parte aérea depende do besourinho vetor *Hypocryphalus mangiferae* que é específico de mangueira e inicia o ataque num ramo da árvore. Na seqüência a doença progride rumo ao tronco, havendo uma sucessão de espécies de coleobrocas na árvore. O controle deve ser feito no início da infecção com corte do ramo doente, abaixo da região infectada, mas só tem-se resultado se a raiz estiver sadia.

O fungo necrosa os raios medulares, comprometendo o xilema, causando murcha e secamento da planta, que se processa rapidamente, permanecendo as folhas mortas aderidas à planta por muito tempo, mesmo depois de sua morte (Figura 04a). A transmissão do fungo de uma árvore doente para uma sadia é associada com insetos vetores.

Os sintomas no tronco se expressam em forma de lesões de coloração acinzentadas com regiões mais claras (Figura 04b). Essas lesões também podem ocorrer nas raízes. O sintoma marcador é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras (FERREIRA & MILANI, 2002), da medula para o exterior do lenho, ou da periferia do lenho para a medula, ou descoloração (mancha escura), do tipo cunha, em geral da periferia para a medula.

a) b)

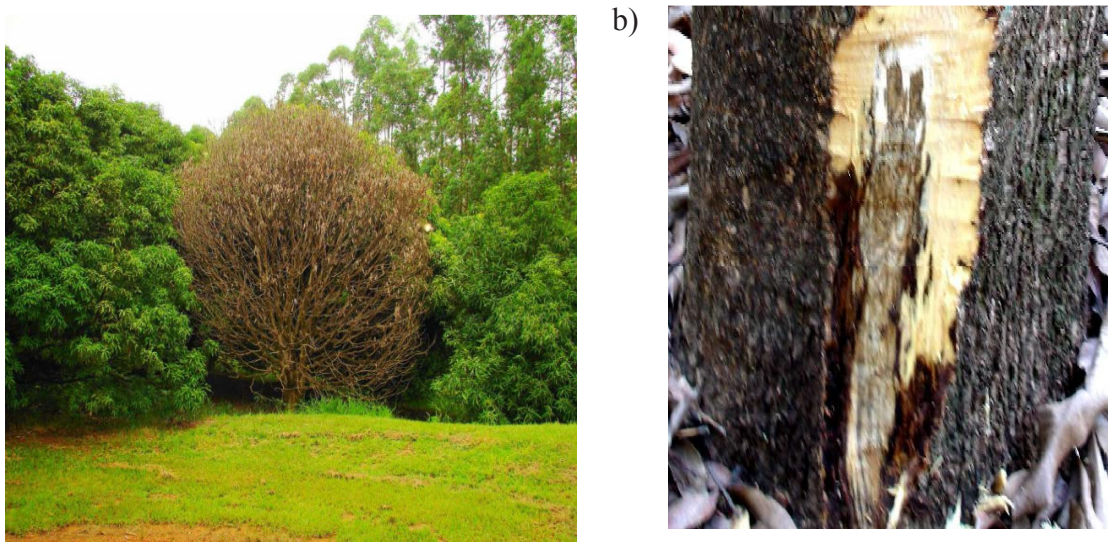

Figura 04: a) seca da copa de mangueiras; b) lesão em tronco de mangueira provocado pelo fungo *C. fimbriata.*

Os sintomas no tronco se expressam em forma de lesões de coloração acinzentadas com regiões mais claras (Figura 2b). Essas lesões também podem ocorrer nas raízes. O sintoma marcador é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras (FERREIRA & MILANI, 2002), da medula para o exterior do lenho, ou da periferia do lenho para a medula, ou descoloração (mancha escura), do tipo cunha, em geral da periferia para a medula.

A detecção de *C. fimbriata* a partir de xilema infetado dá-se, rotineiramente, a partir de pedaços de lenho afetado deixados em câmara úmida, ou transferindo fragmentos de lenho infetado para meio de cultura, como BDA ou similar (FERREIRA, 1989), ou pela deposição de fragmentos de lenho doente entre fatias de cenoura usadas como isca (BAKER & HARRINGTON, 2004), sendo que essa técnica de isca foi considerada seletiva, por MOLLER & DE VAY (1968), para a constatação de *C. fimbriata.* Com as técnicas citadas, o tempo mínimo básico para a constatação do patógeno é de quatro a cinco dias, sendo necessária a atividade vital do fungo.

Além de infectar o tronco e as raízes, pode afetar flores e frutos com sintomas semelhantes aos da antracnose. O controle mais eficiente e econômico para a murcha-de-Ceratocystis é o uso de material genético resistente.

2.3 – Marcadores Moleculares

A variabilidade genética é um instrumento de investigação muito importante para os pesquisadores em seus estudos quando desejam verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo para ajudar na identificação de restos de espécies ameaçadas de extinção.

Os dados básicos para esses estudos, denominados marcadores moleculares, são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade. Por meio do uso de marcadores moleculares, técnicas avançadas têm sido empregadas em pesquisas, permitindo que os pesquisadores alcancem maior eficiência em estudos de diversidade genética.

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados "marcadores moleculares". Sendo assim, marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). A revolução neste plano se iniciou com o descobrimento e utilização de marcadores isoenzimáticos a partir do ano de 1959, ampliando vastamente o número de marcadores genéticos e possibilitando a aplicação da técnica praticamente todas as espécies de plantas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA,1998).

Marcadores moleculares podem ser utilizados habitualmente em programas de melhoramento genético, tanto para caracteres quantitativos como qualitativos, seja em investigação básica ou aplicada. Diversos empregos de marcadores em melhoramento de plantas podem ser distribuídos em aplicações cujos resultados apresentam expectativas de curto, médio e longo prazo. No melhoramento clássico as aplicações em curto prazo incluem, basicamente, a identificação e a discriminação de genótipos.

Nas aplicações analíticas de médio e longo prazo, os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética existente ao nível de seqüência de DNA e correlacioná-la com a expressão fenotípica em procedimentos de mapeamento genético. Nas aplicações sintéticas, a informação gerada na fase analítica, é integrada às metodologias de seleção e recombinação de genótipos, como uma ferramenta adicional para promover o avanço genético.

Os marcadores moleculares tornaram-se ferramentas fundamentais na construção de mapas genéticos, permitindo a clonagem de genes que podem ser utilizados também no melhoramento via transgenia. Além de sua importância no melhoramento, os marcadores também são importantes nos estudos genéticos das plantas, detectando variações no genoma,

aumentando o poder da análise genética. Uma grande variedade de marcadores moleculares está disponível para as diferentes espécies de vegetais (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Os marcadores isoenzimáticos foram desenvolvidos pelos pesquisadores MARKET & MOLLER em 1959. São formas distintas de uma enzima, não precisam estar num mesmo indivíduo, com função catalítica idêntica ou similar que diferem entre si na seqüência de aminoácidos.

O princípio básico da técnica consiste na utilização de eletroforese em gel e na visualização da atividade enzimática por métodos histoquímicos. Trata-se de uma técnica de fácil manipulação, ainda muito utilizada, custo relativamente baixo, permite analisar vários sistemas isoenzimáticos e grande número de indivíduos e permite visualizar marcadores co-dominantes.

Tem como propriedade mais expressiva a base genética simples envolvida na expressão destas enzimas (SOLTIS & SOLTIS, 1989), entretanto apresenta como limitações uma cobertura reduzida dos genomas investigados, devido ao pequeno número de locos que podem ser detectados, e o baixo nível de polimorfismo identificado por loco (ALFENAS, 1998; BORÉM & CAIXETA, 2006).

A partir da década de 70, com a descoberta das enzimas de restrição na década anterior, surgiu o primeiro marcador molecular que possibilitou detectar diferenças entre indivíduos através de cortes no DNA estudado, o RFLP – *Restriction Fragment Lenght Polymorphism* (polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição). Com esta técnica, o DNA genômico de um indivíduo pode ser isolado e digerido com enzimas de restrição, os fragmentos obtidos são separados em um gel num processo denominado eletroforese, gerando fragmentos de tamanho e número variáveis que evidenciam o polimorfismo genético. Os fragmentos são transferidos para uma membrana de náilon ou nitrocelulose – técnica denominada *Southern blot*. A próxima etapa consiste na hibridização do DNA das amostras já imobilizado em membranas com uma sonda radioativa de DNA complementar ao fragmento de interesse. A última etapa é a autoradiografia, ou seja, exposição da membrana hibridizada com a sonda radioativa a um filme de Raios-X, revelando a presença de bandas, que são os marcadores RFLP (HELENTJARIS et al., 1986).

Uma das principais vantagens desse marcador é a sua expressão co-dominante, que permite distinguir indivíduos homozigóticos de indivíduos heterozigóticos, outra vantagem que merece destaque é a possibilidade de utilização de sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre as espécies. As principais desvantagens são o trabalho que

envolve a execução de várias etapas, o alto custo e o uso de radioatividade (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Na década de 80, foi desenvolvido pelo pesquisador Kary Mullis uma tecnologia simples e eficiente que é a reação em cadeia da polimerase – PCR (Polymerase Chain Reaction). Através deste processo é possível multiplicar *in vitro* e em escala exponencial cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia na reassociação e extensão enzimática de um par de *primers* que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, os *primers* são sintetizados artificialmente e são complementares às regiões que flanqueiam a região alvo.

Cada ciclo de PCR envolve três etapas, desnaturação através da elevação da temperatura de 92°C para 95°C, reassociação, em que a temperatura é rapidamente reduzida para 35°C a 60°C, e extensão que ocorre quando a temperatura é elevada para 72°C. Este ciclo é repetido por várias vezes e, ao final da reação, há uma grande quantidade de DNA de uma seqüência específica de interesse. Os produtos da PCR podem ser visualizados num gel de agarose. Esta visualização é possível com auxílio do brometo de etídeo, que quando presente no gel se intercala entre as bases nitrogenadas no DNA e o torna visível com absorção de um comprimento de onda menor e emissão de um comprimento de onda maior de luz ultravioleta (MULLIS & FALOONA, 1987).

O desenvolvimento desta técnica levou Kary Mullis a ganhar o prêmio Nobel de química em 1993, devido ao impacto causado pela PCR e dos métodos dela derivados (NOBELPRIZE, 2006). A técnica de PCR promoveu também o surgimento de novos marcadores moleculares tais como os marcadores RAPD, STS, SCARS, AFLP, SNPs e Microssatélites. Estes são os mais importantes e serão discutidos a seguir.

O RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (DNA polimórfico amplificado arbitrariamente) – é basicamente uma variação do protocolo de PCR, difere em duas características, utiliza um *primer* único e menor ao invés de um par de *primers* e este tem seqüência alvo desconhecida. Esta técnica permite a detecção de fragmentos aleatórios de DNA. Em relação aos RFLPs, os RAPDs são mais baratos, requerem pouco tempo e não necessitam de radioisótopos, entretanto são marcadores dominantes. Outra desvantagem deste marcador é que se trata de uma técnica muito sensível que não oferece reprodutibilidade entre laboratórios (WILLIAMS, 1990)**.**

PARAMN & MICHELMORE (1993) foram os primeiros pesquisadores a utilizar os marcadores STS – *Sequence Tagged Sites* (sítios marcados por seqüências), em plantas, eles também definiram estes marcadores como DNAs de seqüências curtas e de cópia única, que

podem ser identificados mediante amplificação via PCR e, ou hibridização. BORÉM & CAIXETA (2006) citam os STS como uma conversão de RFLP em marcadores baseados em PCR, que oferecem grande vantagem em relação aos marcadores RAPD por apresentarem co-dominância, ou seja, podem distinguir homozigoto de heterozigoto e são também mais reproduzíveis que os RAPDs. Entretanto, as STS requerem algum conhecimento prévio da seqüência do DNA-alvo.

Os marcadores SCAR – *Sequence Characterized Amplified Regions* (regiões amplificadas caracterizadas por seqüências), a exemplo de STS, são outra categoria de marcador molecular desenvolvida por conversão de um determinado marcador em outro. Conforme PARAMN & MICHELMORE (1993), os SCARs podem conter seqüências de DNA repetitivo e são usados como pontos de referência física no genoma e como marcadores genéticos. Os pesquisadores propuseram originalmente que SCAR é a conversão de marcadores RAPD, que são obtidos com *primers* de seqüência arbitrária, para marcadores de seqüência específica. XU et al. (2004) também converteram os marcadores AFLP em marcadores do tipo SCAR. Para desenvolver marcadores SCAR é necessária a identificação de um *primer* que confere polimorfismo a dois *bulks* de DNA com fenótipos contrastantes, em seguida o isolamento e a clonagem do fragmento amplificado em um vetor, seqüenciamento do fragmento isolado, desenho dos pares de *primers* específicos de 16 a 24 nucleotídeos complementares às extremidades do fragmento seqüenciado, e por fim validar estes *primers* em reações de PCR, para verificar se eles amplificam DNAs genômicos da espécie para qual eles foram desenhados (BÓREM & CAIXETA, 2006).

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados), são marcadores moleculares desenvolvidos por ZABEAU (1993) citado por VANTOAL et al. (1996), cuja técnica combina a digestão de fragmentos de DNA com enzimas de restrição de corte raro e enzimas de corte freqüente e a amplificação desses fragmentos por PCR. Assim sendo, o DNA de um indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição, são ligados às extremidades dos fragmentos digeridos adaptadores específicos de DNA fita dupla, que servem de sítios de reassociação dos *primers* para posterior reação de PCR, os produtos dessas amplificações são separados em gel de poliacrilamida desnaturante e o polimorfismo é identificado pela presença ou ausência de bandas (VOS et al., 1995). Assim como os marcadores RAPD, estes marcadores apresentam dominância e são mais caros que RAPD. Apresenta como vantagens a visualização em um único gel de um grande número de fragmentos gerados, proporcionando uma amostragem

ampla e simultânea de um genoma, grande poder de detecção de variabilidade genética, apresenta maior robustez quando comparado com RAPD.

Alterações de uma única base no genoma, ocorrendo a cada 600 pares de bases aproximadamente, ao se comparar segmentos correspondentes de um genoma, são denominados SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms* (polimorfismo de um único 25 nucleotídeo), quando correspondem a posições onde existe uma alternância dos nucleotídeos A, C, G, T em uma freqüência alélica mínima de 1% em uma dada população (BROOKES, 1999). Os SNPs são, portanto, marcadores genéticos baseados na detecção de polimorfismos resultantes destas alterações, que devido à freqüência em que ocorrem tornam estes marcadores importantes ferramentas para obtenção de mapas de alta resolução. A detecção de SNPs emprega algumas metodologias; inicialmente a detecção consistia em amplificar e seqüenciar fragmentos genômicos equivalentes, de regiões gênicas específicas do DNA de vários indivíduos, e comparar suas seqüências em busca de variações. A via direta para identificação de SNP é o seqüenciamento direto de fragmentos de DNA, amplificados por PCR, com *primers* desenhados para este fim. A identificação também pode ser feita por análise eletrônica de variação pontual (KWOK, 2001).

Os Microssatélites e os ISSRs foram os marcadores moleculares utilizados como ferramenta neste estudo, então para melhor entendimento da metodologia adotada e das formas de análises, serão abordados de forma mais detalhada a seguir.

2.3.1– Marcadores Microssatélites

Segundo HAMADA et al. (1982) e TAUTZ & RENZ (1984), os genomas dos eucariotos estão densamente povoados por diferentes classes, mais ou menos complexas, de seqüências repetidas, origem do termo SSR – *Sempre Sequence Reptas*, ou STR – *Short Também Reptas*, mais tarde chamados de marcadores Microssatélites. São repetições de pequenas seqüências de um a seis nucleotídeos adjacentes repetidos em linha, sendo encontrados amplamente distribuídos pelo genoma da maior parte dos eucariotos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; TOTH et al., 2000; ZANE et al., 2002). Foram descritos em plantas pela primeira vez por CONDIT & HUBBELL (1991), que detectaram a presença das repetições (AC)n e (AG)n. MORGANTE & OLIVIERI (1993) constataram em 34 espécies vegetais a presença de microssatélites, sendo o dinucleotídeo AT o elemento repetido mais

comum; também constataram que estes marcadores estão em menor freqüência que nos vertebrados, mas em maior freqüência que nos invertebrados e fungos.

Estudos apontam para o *slippage*, ou o deslizamento da polimerase, como o principal mecanismo por trás do surgimento e amplificação destas seqüências repetitivas nos genomas, gerando alta taxa de mutação dos microssatélites, numa freqüência de 10^{-3} e 10^{-4} por loco por gameta a cada 26 gerações. Acredita-se que durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e unem-se novamente de forma incorreta, o que geraria cópias de trechos de DNA (alelos) com diferentes tamanhos ou números de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição. O problema também pode estar associado ao sistema de reparo pela DNA polimerase ou ainda, ser conseqüência do processo de recombinação (SCHLOTTERER & TAUTZ, 1992; FIELD AND WILLS, 1996).

Durante o processo de recombinação o *crossing-over* desigual pode ser responsável pela alta taxa de polimorfismo destes marcadores, que por problemas no pareamento dessas seqüências durante o quiasma, aumenta a taxa de mutação das regiões microssatélites e são estas mutações que tornam estes marcadores tão informativos (STRAND et al., 1993; SCHLÖTTERER et al., 1998).

O polimorfismo de um loco microssatélite é resultado do número de repetições do motivo que o caracteriza. Portanto, os diferentes alelos que um loco microssatélite pode apresentar distinguem-se uns dos outros pelo número de repetições que apresentam. Adotemos como exemplo, um loco em que o dinucleotídeo "CG" é a unidade de repetição, o polimorfismo que distinguirá os alelos deste loco dependerá da presença de números variáveis dessa unidade de repetição, então um alelo pode ser definido, por exemplo, pela ocorrência de 20 unidades de "CG" adjacentes repetidos lado a lado, enquanto que outro alelo deste loco pode apresentar apenas 18 repetições.

CHAMBERS & MACAVOY (2000) sugerem que são necessários, para iniciar um processo de origem de um microssatélite, no mínimo oito nucleotídeos repetidos em *tandem*. Os microssatélites são classificados conforme a composição das seqüências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTGTAGTGTGTT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes, por exemplo: GTGTGTGTGTGTCACACACACACA (BORÉM & CAIXETA, 2006).

Em geral, apesar das seqüências microssatélites variarem de um indivíduo para o outro, as seqüências de DNA que as flanqueiam são bastante conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Conhecendo as regiões é possível desenhar *primers* específicos para essas regiões adjacentes às seqüências microssatélites, possibilitando a amplificação via PCR dos fragmentos que contêm o DNA repetitivo em diferentes genótipos. Os produtos da amplificação podem ser visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante ou não desnaturante, em gel de agarose de alta resolução ou por meio de *primers* fluorescentes em seqüenciador automático, e o polimorfismo entre as bandas serão decorrentes dos tamanhos diferentes de elementos simples repetidos. Cada segmento de DNA representa um alelo daquele loco específico (SOUZA, 2001; ALVES, 2002; BORÉM & CAIXETA, 2006). O alto poder discriminatório deste marcador é uma característica importante que merece destaque, motivo pelo qual é amplamente utilizado em estudos de genética de populações, análises de paternidade e forense (OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo SLATKIN (1995) são marcadores ideais para estudos de genética e evolução de populações naturais devido ao alto poder discriminatório, à robustez, confiabilidade, praticidade operacional e por serem marcadores mais informativos geneticamente. Os microssatélites apresentam características altamente desejáveis (SUGANUMA & CIAMPI, 2005): são marcadores co-dominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser visualizados no gel; estão ampla e uniformemente distribuídos pelo genoma dos eucariotos; são multialélicos; são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA; uma vez desenvolvidos os *primers* que amplificam tais regiões do genoma, estes podem ser facilmente compartilhados entre laboratórios; *primers* marcados com fluorescência apresentam a vantagem de possibilitarem sistema multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo.

O emprego da tecnologia dos microssatélites envolve algumas limitações, como a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de microssatélites de cada espécie. Entretanto, ocorre conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas, possibilitando aproveitar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O uso de marcadores co-dominantes possibilita a obtenção de informações fornecendo subsídios para entender a dinâmica evolutiva das espécies auxiliando na adoção de estratégias de conservação e melhoramento genético, manejo de populações naturais, podendo

determinar o impacto da influência antrópica na variabilidade das espécies (HAMRICK, 1989; SEOANE et al., 2001).

2.3.2– Marcadores ISSRs

Os marcadores ISSR são marcadores que amplificam seqüências inter regiões microssatélites. Apesar de serem marcadores dominantes, não sendo possível detectar o genótipo heterozigoto, são mais robustos que os RAPDs, pelo fato de seus *primers* serem maiores e, conseqüentemente, mais específicos (LIU et al., 2001).

Os ISSRs representam uma das classes de marcadores moleculares mais recentes e foi desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de seqüenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

São facilmente detectados usando poucos equipamentos, são bastante variáveis e fornecem grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador. O princípio da técnica é baseado em PCR (Reação Em cadeia da Polimerase) e envolvem amplificações de segmentos de DNA presente numa região de distância amplificável entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas orientadas em direções opostas. As amplificações não requerem informação da seqüência do genoma e conduz a multilocos e altos padrões polimórficos.

ISSR é uma técnica simples rápida e eficiente. Os produtos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pb de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade possivelmente devido ao uso de *primers* longos (16 a 25pb) na qual permite um subseqüente uso de alta temperatura de anelamento (variando de 45º a 60º) (BORNET e BRANCHARD; 2001).

Os marcadores ISSR tem sido utilizados para estimar a extensão da diversidade genética a nível inter e intra-específico em uma ampla variedade de espécies. Devido à sua abundância e dispersão no genoma, tem sido muito empregado para estudar relações entre duas populações muito relacionadas.

Esses marcadores vêm sendo utilizados desde a década de 1990 como fonte de polimorfismo na identificação de genótipos, confecção de mapas genéticos, seleção assistida em programas de melhoramento, estudos filogenéticos, avaliação e conservação de germoplasma (COSTA et al., 2002), além do estudo de populações naturais de plantas brasileiras, como por exemplo, o pequizeiro (FERNANDES, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal – *Mangifera Indica*

Visando a obtenção de informações para a caracterização do BAG, utilizamos locos microssatélites e ISSRs em 87 genótipos de manga da coleção do Polo Noroeste da DDD/APTA Votuporanga, mais dois genótipos do Rio de Janeiro e um porta enxerto da região de Presidente Prudente – SP (Tabela 01).

Tabela 01: Relação de *Mangifera indica* do BAG de Votuporanga.

COLEÇÃO MANGA - APTA / Votuporanga

ID	Nomes	ID	Nomes
1	Itamaracã - Votuporanga	31	Tommy Atkin
2	Carlotinha	32	Van Dyke
3	Hamaracá - Cardoso	33	Boubon Vermelha
4	Extrema - Votuporanga	34	Ubá Votuporanga
5	Itamaracá - Canteiro de frutas Votuporanga	35	Ubá Paracatu
6	Azenha - Valinhos - SP	36	Espada Itápoles planta 2
7	Imperial de Piracicaba Dr. Julio	37	Beta
8	Rosa Estrada - Votuporanga	38	Dona Maria
9	Manga Preta - São Gonçalo - RJ	39	IAC 107 Castro
10	Manga Verde - São Gonçalo - RJ	40	Votupa
11	Sabina	41	Kent
12	Winter	42	Santo Antônio
13	Rosa da Vila (Cosmorama) SP	43	Haden 2H (clone do IAC)
14	São Quirino	44	IAC 106 Ubá (IAC)
15	IAC 101 Ourinho	45	Mallika
16	Espadona Stahl (var gen de espada stahl)	46	Hamaracá
17	F1 (sensation x) suscetível a mosca	47	IAC 106 Ubá
18	Keitt Pequena (Mogi)	48	Fafá
19	Bourbon Tupã	49	Kilo
20	Berton	50	Espada Vermelha
21	Falsa Haden	51	IAC 104 Dura
22	Ouroporanja	52	Coração de Boi (Jaidenópolis)
23	Bourbon Votuporanja	53	IAC 102 Touro
24	Boarolo	54	IAC 100 Bourbon
25	Santa Maria	55	IAC 105 Palmera
26	Coração de Boi 2	56	Irwin
27	Coração de Boi 1	57	Tinfan
28	Ubá Viçosa 1 (Rogério)	58	Maçã Vermelha
29	Ubá Viçosa 2 (Rogério)	59	Ômega
30	Mamão Bahia (Itiuba)	60	Manila (Carabao)

Continua...

Tabela 01:... *Continuação*

ID	Nomes	ID	Nomes
61	Natalina	76	Sensation
62	Lolita	77	Lira
63	Bourbon Nogueira	78	Monzanillo
64	Pêssego	79	Espada de Hápolis planta 1
65	IAC 112	80	Roxa
66	Espada Ouro de Itaparica	81	Alfa
67	Nogueira	82	Palmer
68	Rosa de Varito Antão(Pernambuco)	83	Ataulto
69	Neldica	84	Surpresa
70	Heidi	85	Parvin
71	Joa	86	Espada Stahl
72	IAC 111	87	Carlotinha? (Itamaracá)?
73	Rosa de Campinas	88	Rosinha Nhandeara
74	Rosa de Tanabi	89	Itamaracá Nhandeara
75	Pico	90	Juliana

Os materiais vegetais (folhas) coletados dos diferentes genótipos foram armazenados separadamente em freezer a –20ºC e posteriormente macerados com nitrogênio liquido, em almofariz, e armazenados também em freezer a -20ºC para posterior extração de DNA.

Para os marcadores SSRs, foram utilizados 84 indivíduos dos 90 acessos do BAG de Votuporanga e para os marcadores ISSRs, foram utilizados 65 indivíduos. Essa diferença se deve a qualidade dos DNAs extraídos.

3.1.2. Extração e Quantificação de DNA

O DNA foi extraído a partir de 500 mg de tecido vegetal macerado utilizando o protocolo CTAB descrito por DOYLE & DOYLE (1990) com modificações: (1) Em eppendorffs de 1,5 mL identificados para cada amostra foram adicionados 30 mg do tecido macerado; (2) foram adicionados 800 µL de tampão de extração (pré-aquecido a 65ºC), os tubos foram fechados e agitados para ressuspender o tecido no tampão; (3) foram levados ao banho-maria (65ºC) por 60 minutos, agitando-os manualmente a cada 10 minutos; (4) após serem retirados do banho-maria e com a mistura em temperatura ambiente foram adicionados 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1); (5) os tubos foram agitados por 5 minutos invertendo-os no mínimo 20 vezes até fazer uma emulsão homogênea; (6) os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm; (7) o sobrenadante foi transferido para novos tubos

também marcados; (8) foram adicionados 70% (v/v) do volume (≈ 500 µl) de isopropanol gelado, misturado suavemente até formar um precipitado; (9) os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 12000 rpm; (10) suavemente foi descartado o máximo de sobrenadante invertendo os tubos sem perder o pellet; o precipitado secou a temperatura ambiente; (11) foram adicionados 500 µL de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, deixando-o imerso por 5 a 10 minutos, invertendo-o suavemente; (12) os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 12000 rpm; (13) foi retirado o máximo do etanol sem perder o pellet; (14) foi adicionado 500 µL de etanol 95% (v/v) para lavar o precipitado, invertendo-o suavemente; (15) os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 12000 rpm; (16) foi retirado o máximo do etanol e o pellet secou em temperatura ambiente; (17) cada precipitado foi dissolvido em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de 1 µL RNAse (10mg/mL) e deixado sobre bancada *overnight*. As amostras foram então armazenadas a –20ºC.

A fim de se conhecer a qualidade e quantidade do DNA extraído, a solução obtida foi aplicada em gel de agarose feitos em solução TBE 1X. A solução TBE 1X foi feita a partir da diluição de uma parte de solução TBE 10X em nove partes de água destilada. A solução TBE 10X foi composta de 10,8% (p/v) de Tris Base, 5,5% (p/v) de Ácido Bórico e 4,0% (v/v) de solução EDTA 0,5 M pH 8.0 em água destilada autoclavada. A agarose foi colocada em enlenmeyer de 500 ml, juntamente com o volume de TBE 1X e 50µl Sybr Safe (Invitrogen), e fervida em forno de microondas até sua completa dissolução. O gel polimerizado foi colocado então na cuba de eletroforese.

Os cinco primeiros poços do gel receberam quantidades conhecidas do fago lambda (50 ηg, 100 ηg, 150 ηg, 200 ηg e 300 ηg). Os demais poços receberam 5µl de DNA cada.

As amostras foram submetidas a eletroforese a uma voltagem de 130 V por 60 minutos. Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi retirado da cuba e levado para o aparelho de fotodocumentação (BioRad Gel Doc 1000).

Após eletroforese a quantificação das amostras foi estimada pela intensidade de fluorescência emitida pelo Sybr Safe sob UV em géis de agarose a 1% (p/v). Essa intensidade foi comparada à de padrões com pesos moleculares e concentrações específicas e conhecidas (DNA do fago λ).

A intensidade e tamanho das bandas produzidas pelas amostras foram comparadas com a daquelas produzidas pelas amostras de concentração conhecida. Assim foi possível estimar a concentração de DNA em cada uma das amostras.

Neste mesmo gel foi possível avaliar a qualidade geral das amostras, observando se o DNA presente estava íntegro ou degradado. Após a quantificação, todas as amostras foram padronizadas sendo diluídas a 10 ηg/µl.

3.1.3. Caracterização de Marcadores Microssatélites

Para este trabalho foram testados 34 de pares de *primers* para a genotipagem da espécie.

Todos os *primers* testados foram tirados de literatura segundo DUVAL et al. (2005) e CHITOSE HONSHO et al. (2005), conforme tabela 02.

Tabela 02: *Primers* microssatélites sintetizados, com seus respectivos motivos, temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação esperado dos acessos (pb) de acordo com DUVAL et al. (2005) e CHITOSE HONSHO et al. (2005).

Primer's	Acessos do GenBank		Sequencias de *primer's* (5' 3')	Motivos	Ta (°C)	Produto (bp)
* M. MICIR 01	AJ635163	F:	TGAGTTGTTGTCCTGCT	$(TC)_6GTTTCT(TG)_9$	63	191
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATGGTGCTTGTTTCTCGT			
* M. MICIR 02	AJ635164	F:	AAACAAAGAATGGAGCA	$(TG)_7$	60	253
		R:	ACCAACCTAGGAAACACAGTTGGACTGAATGTGGATAG			
* M. MICIR 03	AJ635165	F:	GATGAAACCAAAGAAGTCA	$(TG)_{10}$	60	319
		R:	ACCAACCTAGGAAACACAGTCCAATAAGAACTCCAACC			
* M. MICIR 04	AJ635166	F:	CTTGAAAGAGATTGAGATTG	$(GT)_8$	60	210
		R:	ACCAACCTAGGAAACACAGTAGAAGGCAGAAGGTTTAG			
* M. MICIR 05	AJ635167	F:	GCCCTTGCATAAGTTG	$(TG)_{14}$	62	181
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATTAAGTGATGCTGCTGGT			
* M. MICIR 06	AJ635168	F:	TCTAAGGAGTTCTAAAATGC	$(GT)_9$	60	177
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATCTCAAGTCCAACATACAATAC			
* M. MICIR 08	AJ635170	F:	GACCCAACAAATCCAA	$(AT)_6G(TG)_{14}(TATG)_6$	60	163
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATACTGTGCAAACCAAAAG			
* M. MICIR 09	AJ635171	F:	AAAGATAAGATTGGGAAGAG	$(AC)_{10}$	60	165
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATCGTAAGAAGAGCAAAGGT			
* M. MICIR 10	AJ635172	F:	TAGGGATATAGCTGGAGG	$(TG)_{13}$	60	284
		R:	ACCAACCTAGGAAACACAGTACGCAGTAGAACCTGTG			
* M. MICIR 11	AJ635173	F:	CAGCCTTATGTGTTGAAG	$(TG)_{10}$	63	191
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATAAACTAAACAAGCTGAACC			
* M. MICIR 12	AJ635174	F:	CTTCATTTCTCCACTTTTG	$(TG)_8$	52	231
		R:	ACCAACCTAGGAAACACAGTATGAAATACTGGCTGGTT			
* M. MICIR 13	AJ635175	F:	GCGTAAAGCTGTTGACTA	$(GT)_{10}$	60	156
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATTCATCTCCCTCAGAACA			
* M. MICIR 14	AJ635176	F:	GAGGAACATAAAGATGGTG	$(TG)_{11}$	60	162
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATGACAAGATAAACAACTGGAA			
* M. MICIR 16	AJ635178	F:	TAGCTGTTTTGGCCTT	$(AT)_6$	52	240
		R:	ACCAACCTAGGAAACACAGTATGTGGTTTGTTGCTTC			
* M. MICIR 18	AJ635180	F:	CCTCAATCTCACTCAACA	$(AC)_8$	52	234
		R:	ACCAACCTAGGAAACACAGTACCCCACAATCAAACTAC			
* M. MICIR 20	AJ635182	F:	GACTTGCAGTTTCCTTTT	$(AC)_{14}$	60	173
		R:	GACTATGGGCGTGAGTGCATTCAAGAACCCCATTTG			

Continua...

Tabela 02:...*Continuação*

Primer's	Acessos do GenBank	Sequencias de *primer's* (5' 3')	Motivos	Ta (°C)	Produto (bp)
* M. MICIR 21	AJ635183	F: CCATTCTCCATCCAAA	$(TG)_8$	60	168
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATTGCATAGCAGAAAGAAGA			
* M. MICIR 22	AJ635184	F: TGTCTACCATCAAGTTCG	$(AC)_{16}$	60	168
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATGCTGTTGTTGCTTTACTG			
* M. MICIR 24	AJ635186	F: ATTTTGATTCCCGTTCT	$(AC)_{10}$	60	233
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTATTCGATCATGGTTTTG			
* M. MICIR 25	AJ635187	F: ATCCCCAGTAGCTTTGT	$(CA)_6$	60	211
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTTGAGAGTTGGCAGTGTT			
* M. MICIR 27	AJ635189	F: ACGGTTTGAAGGTTTTAC	$(TTCA)_4TTCCCGTATCTGAATACA(AC)_6$	63	150
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATATCCAAGTTTCCTACTCCT			
* M. MICIR 28	AJ635190	F: AAGAGGGAATCTTAATCAAC	$(CA)_7$	63	187
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATGTCGTTTTGCGTTAGTG			
* M. MICIR 29	AJ635191	F: GCGTGTCAATCTAGTGG	$(AC)_{11}$	63	176
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATGCTTTGGTAAAAGGATAAG			
* M. MICIR 30	AJ938175	F: GCTCTTTCCTTGACCTT	$(TG)_{12}$	60	193
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATTCAAAATCGTGTCATTTC			
* M. MICIR 32	AJ938177	F: TCATTGCTGTCCCTTTTC	$(TG)_{19}$	60	189
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATATCGCTCAAACAATCC			
* M. MICIR 33	AJ938178	F: GTATAAATCGCGTGCAT	$(TA)_6(TG)_7TTTATGCTTGA(AT)_2A(AT)_6$	60	232
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTAGTTTCCCTCCTTGTATCT			
* M. MICIR 34	AJ938179	F: TCGGTCATTTACACCTCT	$(AATA)_3(AC)_8$	60	201
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTTTATTGAGCTTCTTTGTGTT			
* M. MICIR 36	AJ938181	F: ACCACGAAAAGACAACTC	$(TG)_{11}$	60	264
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTTCATCTTTGTTAAATAGGTTAAT			
+ M. IAC 02	AB190345	F: GCTTTATCCACATCAATATCC	(TA)2(CA)10TA(CA)3TA(CA)4	53,3	167
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATTCCTACAATAACTTGCC			
+ M. IAC 03	AB190346	F: TAAGCTAAAAAGGTTATAG	(AC)11 TCAC(TC)10 (AC)3	54	190
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATCCATAGGTGAATGTAGAGAG			
+ M. IAC 04	AB190347	F: CGTCATCCTTTACAGCGAACT	(AC)10	55	101
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATCATCTTTGATCATCCGAAAC			
+ M. IAC 05	AB190348	F: AATTATCCTATCCCTCGTATC	(ACACACAT)3(ACACACACAT)3	54,5	139
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATAGAAACATGATGTGAACC			
+ M. IAC 06	AB190349	F: CGCTCTGTGAGAATCAAATGGT	(AT)14(GT)18	59,1	295
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTGGACTCTTATTAGCCAATGGGATG			
+ M. IAC 11	AB190350	F: GTGCGAGGAGATATCTGT	(CT)5(CA)6	55,1	111
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATCTGGTTCTTCATTGTTGAGATG			

* Durval, et al. (2005); + Chitose Honsho et al. (2005)

As reações de PCR foram realizadas conforme a tabela 03.

Para os locos estudados, o ciclo total das amplificações foi realizado em um termociclador Bio-Rad (My Cycles) programado para iniciar com 5 minutos a 94ºC para uma desnaturação inicial, seguido por 33 ciclos com: 1 minuto de desnaturação a 94ºC, 1 minuto de pareamento a 60ºC e 1 minuto de extensão a 72ºC. Para a adesão da fluorescência foi acrescentado mais 8 ciclos com: 1 minuto a 94ºC para uma desnaturação inicial, 1 minuto de pareamento da fluorescência a 53ºC, 1 minuto de extensão a 72ºC e finalizando com 8 minutos a 72ºC para extensão final.

Tabela 03: Reações de PCR para os diferentes *primers* SSRs.

Reagentes		Reação 01	Reação 02
Água	qsp	20,0 µl	20,0 µl
Tampão [10x]		2,0 µl	2,0 µl
$MgCl_2$ [50mM]		4,0 mM	4,0 mM
dNTP [2,5mM]		0,4 mM	0,4 mM
Taq		1U	1U
Primer direito [10µM]		2,0 µM	3,0 µM
Primer reverso [10µM]		2,0 µM	3,0 µM
Fluorescência [1µM]		0,5 µM	1,0 µM
DNA [10ηg/µl]		30 ηg	50 ηg
Volume final		**20,0 µl**	**20,0 µl**

Os produtos de amplificação foram separados sob condições desnaturantes em gel 7% de poliacrilamida (v/v), por cerca de 4 horas a 70 Watts de potência. Um marcador de alelo foi usado como padrões de tamanho de DNA em escala de 10 pb (Invitrogen). Após a amplificação, o gel foi corado com nitrato de prata (MERRIL et al., 1981) seguindo as modificações propostas por CRESTE et al. (2001).

3.1.4. Caracterização de Marcadores ISSRs

Para este trabalho foram testados 15 de pares de *primers* para a genotipagem da espécie.

Todos os *primers* testados foram tirados de literatura segundo web site (http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/protocols.ISSR.html. Acesso em julho de 2007) e SILVEIRA et al. (2003) conforme descrito na tabela 04.

Tabela 04: *Primers* ISSRs sintetizados, com seus respectivos motivos, temperatura de anelamento e tamanho (pb).

Primer's	**Sequencias de *primer's* (5' 3')**	**Motivos**	**Ta (°C)**	**Produto (bp)**
1	AGAGAGAGAGAGAGAGAG	(AG)9	45	500 - 1000
4	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	(GA)10	45	400 - 1200
5	CAGCAGCAGCAGCAG	(CAG)5	47	400 - 800
7	GTGGTGGTGGTGGTG	(GTG)5	45	400 - 1200
12	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	(GA)9 - C	52	350 - 1000
13	GACAGACAGACAGACA	(GACA)4	48	900 - 1800
14	GGATGGATGGATGGAT	(GGAT)4	46	700 - 1500
17	GTGGTGGTGGTG	(GTG)4	47	400 - 1500
18	GAGAGAGAGAGAGAGAGAT	(GA)9-T	47	400 - 1100

Continua...

Tabela 04:...*Continuação*

Primer's	Sequencias de *primer's* (5' 3')	Motivos	Ta (°C)	Produto (bp)
*7	CTCTCTCTCTCTCTCTAG	(CT)8 - RG	45	350 - 1100
*MAO	CTCCTCCTCCTCAC	(CTC)4 - RC	47	250 - 1500
*MANNY	CACCACCACCACAC	(CAC)4-RC	45	200 - 1000
*TERRY	GTGGTGGTGGTGGC	(GTG)4-RC	46	300 - 800
*JOHN	AGAGAGAGAGAGAGCC	(AG)7-YC	48	500 - 1000
*844	CTCTCTCTCTCTCTCTAC	(CT)8 - RC	48	450 - 1100

* Biosci (2007); +Silveira et al. (2003); R = pirimidina A ou T; Y = purina G ou C.

As reações de PCR foram realizadas conforme a tabela 05.

Tabela 05: Reações de PCR para os diferentes *primers* ISSR.

Reagentes	Reação 01	Reação 02
Água qsp	20,0 µl	20,0 µl
Tampão [10x]	2,0 µl	2,0 µl
$MgCl_2$ [25mM]	4,0 mM	2,5 mM
dNTP [2,5mM]	0,4 mM	0,4 mM
Taq	1U	1U
Primer [10µM]	1,0 µM	1,0 µM
DNA [10ηg/µl]	50 ηg	50 ηg
Volume final	**20,0 µl**	**20,0 µl**

Para os locos estudados, o ciclo total das amplificações foi realizado em um termociclador PTC200 (MJ Research, Inc.) programado para iniciar com 1 minuto e 30 segundos a 94ºC para uma desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos com: 45 segundos de desnaturação a 94ºC, 45 segundos de pareamento a 50ºC, 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72ºC e finalizando com 5 minutos a 72ºC para extensão final.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% após eletroforese de 2 horas a 130v.

Cada genótipo teve anotado o fragmento estimado em pares de base para posterior análise.

3.1.5. Metodologia de análise estatística dos dados de Marcadores Microssatélites

As freqüências gênicas ou alélicas e genotípicas em cada loco foram obtidas a partir da leitura dos dados nos géis de poliacrilamida.

Após a leitura dos géis, as freqüências alélicas, o número de alelos por loco (A), a heterozigozidade observada (H_O) e esperada (H_E) foram estimadas utilizando o programa GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2000).

A caracterização e estruturação da variabilidade genética foram visualizadas pela matriz de distâncias genéticas de Rogers-W (1978) e pelo critério de agrupamento UPGMA, e para isto utilizou-se o programa TFPGA (MILLER, 1997).

O programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado com a finalidade se ser estimada a estrutura do germoplasma. Foram testadas as probabilidades de 01 a 20 agrupamentos (K=1 a K=20) seguindo os parâmetros: 300000 burning (rodar tempo suficiente para garantir que valores finais sejam independentes dos iniciais, e do número de interações) e 500000 MCMC (rodar simulações independentes para verificar convergência), sendo feitas cinco interações para cada K. Utilizou-se o modelo "no admixture" com freqüências alélicas não correlacionadas, pois trata-se de germoplasma. A escolha do valor de K que melhor agrupasse os acessos foi feita com base em PRITCHARD et al. (2000), isto é, com base no logaritmo da probabilidade de cada K.

3.1.6. Metodologia de análise estatística dos dados de Marcadores ISSRs

Em cada gel foi avaliado o número total de bandas produzidas e número de bandas polimórficas. A partir da leitura dos géis, os indivíduos foram anotados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas, gerando uma matriz binária.

O programa computacional NTSYS (ROHLF, 1989), foi utilizado para gerar uma matriz de similaridades de Jaccard entre todos os pares de indivíduos com base na matriz binária.

A partir desta matriz, o programa gerou dendrogramas baseados no método de agrupamento UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averages*).

A estabilidade ou consistência destes agrupamentos foi testada através do procedimento de reamostragens aleatórias, com 10.000 *bootstraps,* através do programa BooD (COELHO, 2001).

O programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado como descrito anteriormente para marcadores microssatélites.

3.2. Material microbiológico - *Ceratocystis Fimbriata*

Visando a obtenção de informações para a caracterização da coleção de isolados de *C. fimbriata* do IAC, utilizamos locos microssatélites. Foram utilizados 13 isolados de oito localidades do Estado de São Paulo, em função da ocorrência da espécie nesses locais (tabela 06).

Tabela 06: Locais de coleta de ramos de mangueira infectados com *C. Fimbriata*.

Número	Indivíduo	Localidades
1	1.120.36	Campinas - SP
2	2.121.32	Campinas - SP
3	3.137.50-1	Votuporanga - SP
4	4.139.11	Votuporanga - SP
5	5.139.59	Votuporanga - SP
6	6.139.66	Pindorama - SP
7	7.139.77	Santa Barbara D'oeste - SP
8	8.139.87	Pindorama - SP
9	9.139.89	Tupi - SP
10	10.139.92	Pindorama - SP
11	11.139.98	Americana - SP
12	12.140.60	Paulínia - SP
13	13.141.69	Ribeirão Preto - SP

Para a coleta, foi retirado um ramo (de mangueira) infectado com o fungo *C. fimbriata*.

Após a coleta, o material foi isolado e cultivado em meio de cultura BDA e colocado em câmara de BOD para crescer a 24ºC sem foto período (sem incidência de luz). Posteriormente, o material foi macerado com nitrogênio liquido, em almofariz, e armazenados em freezer a -80ºC para posterior extração de DNA

3.2.1. Extração e Quantificação de DNA

As etapas de extração e quantificação foram iguais as descritas anteriormente para *Mangifera indica.*

3.2.2. Desenvolvimento de bibliotecas

Um genótipo de *C. fimbriata* foi escolhido ao acaso, entre os que foram coletados, para obtenção do DNA genômico total a fim de construir uma biblioteca enriquecida com locos microssatélites para a espécie.

O DNA foi extraído utilizando o protocolo CTAB descrito por DOYLE & DOYLE (1990), como apresentado anteriormente.

A construção da biblioteca genômica enriquecida com locos microssatélites foi feita utilizando o protocolo descrito por BILLOTTE et al. (1999) com modificações, conforme os passos a seguir:

Restrição do DNA

Aproximadamente 6,0 μg de DNA genômico foram digeridos utilizando 5,0 μL enzima *Rsa*I (10 U/μL), adicionando-se na reação 10,0 μL de tampão de reação (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM DTT; 25 μg/ml BSA) e água milliQ autoclavada até completar 100 μL. O material foi incubado a 37ºC por 18 horas.

Ligação dos adaptadores

Os adaptadores *Rsa*21 (5´ - CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA - 3´) e *Rsa*25 (5´ - TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A - 3´) foram ligados aos fragmentos digeridos de extremidade abrupta com a enzima T4 DNA ligase (Amershan Pharmacia Biotech). Foram utilizados 2 μL do adaptador *Rsa*21 (10 μM) e 2 μL do adaptador *Rsa*25 (10 μM), 6,0 μL do DNA genômico digerido no passo anterior, 10,0 μL do tampão 5X (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM DTT; 25 μg/ml BSA), 4,0 μL de T4 DNA ligase e água milliQ autoclavada para completar 50,0 μL. Esta reação foi incubada a 20ºC por 2 horas.

Pré-Amplificação via PCR

Para gerar uma maior quantidade de DNA para a seleção, os fragmentos digeridos foram submetidos a uma PCR utilizando como *primer* um dos adaptadores, o *Rsa*21. Após a ligação os fragmentos foram amplificados utilizando 5 μL do produto da ligação; 2,0 μL do *primer Rsa*21 (10 μM); 5,0 μL de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 2,0 μL de $MgCl_2$ (50,0 mM); 4μL de dNTP (2,5 mM), 1,0 μL de *Taq* polimerase (5 U) e água milliQ autoclavada para completar 50,0 μL. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Um passo prolongado de extensão de 72°C por 8 minutos foi adicionado após o último ciclo. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit Concert (Invitrogen Life Sciences).

Seleção dos fragmentos contendo SSR

O processo de enriquecimento foi realizado através da hibridização de oligonucleotídeos conjugados a biotinas, biotIIIII(TTC)10, biotIIIII(CG)10 e biotIIIII(GT)10, complementares a seqüências repetitivas GA, GC e AAG. Os fragmentos contendo tais repetições foram recuperados por estreptavidina ligada a microesferas magnéticas utilizando o kit Streptavidine-Magnesphere (Promega). Para realização das lavagens, as esferas magnetizadas foram atraídas por um imã posicionado lateralmente ao tubo em um suporte.

A fração enriquecida contendo os fragmentos de DNA previamente ligados aos adaptadores foi incubada a 95°C por 15 minutos para a desnaturação da dupla fita. Ao DNA desnaturado foram adicionados 3 µL de cada oligonucleotídeo marcado com as biotinas. Esta solução de hibridização foi incubada a temperatura ambiente sob constante agitação e após 20 minutos foi adicionada às esferas magnetizadas previamente lavadas seguindo as recomendações do fabricante. A suspensão contendo as esferas magnetizadas e o complexo DNA-sonda foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente sob suave agitação.

Após a incubação, foram realizadas lavagens conforme descrito por BILLOTTE et al. (1999) e os fragmentos selecionados foram recuperados através de lavagem com 250 µL de água milliQ autoclavada.

Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR

Após a seleção dos fragmentos enriquecidos, estes foram submetidos a uma PCR utilizando como *primer* o adaptador *Rsa*21. A amplificação foi realizada utilizando 20 µL do produto da ligação; 4,0 µL do primer *Rsa*21 (20 µM); 10 µL de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,9); 4,0 µL de $MgCl_2$ (2,0 mM); 8 µL de dNTP (2,5 mM), 5U de *Taq* polimerase (Invitrogen) e água milliQ autoclavada para completar 100,0 µL. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Um passo prolongado de extensão de 72°C por 5 minutos foi adicionado após o último ciclo.

Clonagem em vetor pGEM-T e transformação em células supercompetentes

Após a amplificação, 3 µL dos produtos da PCR foram ligados a 1 µL do vetor pGEM-T (kit Promega), segundo o protocolo fornecido com o vetor plasmidial, e foram transformados em células XL1-Blue competentes. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/ml), 60 µL IPTG (24mg/ml) e 60 µL X-Gal

(20 mg/ml). As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 18 horas em estufa para o crescimento de colônias.

Manutenção dos clones

Para garantir que cada construção (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para análise posterior, foram utilizadas placas ELISA com fundo em U, com 80 µL de meio LB contendo ampicilina (100µg/ml) por poço. As colônias brancas foram repicadas com a ajuda de palitos estéreis. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight* em estufa para o crescimento de colônias. Após esse período as placas foram armazenadas em freezer -20°C por 30 minutos e então foram armazenadas em freezer -80°C com glicerol 50% (p/v).

3.2.3. Seleção e seqüenciamento dos clones

Amplificação dos insertos clonados

Com o objetivo de identificar os clones contendo microssatélites e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem, foi realizada uma reação de amplificação dos insertos diretamente das colônias obtidas na etapa anterior, utilizando o *primer Rsa*21. Colônias individuais foram transferidas com um palito estéril para o tubo de PCR contendo 30,5 µL de água milliQ estéril. Esta suspensão de células foi utilizada em uma reação com volume final de 45,0 µL contendo as seguintes concentrações dos reagentes: 5,0 µL de tampão 10X (50 mM KCl; 10mM de Tris-HCl, pH 8,9), 4,0 µL de $MgCl_2$ (2,5 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 2,5 µL de *Rsa*21 (10 mM), 1,0 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL). Esta reação foi submetida a um passo inicial de desnaturação a 95ºC por 4 minutos, seguido de 30 ciclos (94ºC por 30 segundos, 52ºC por 45 segundos, 72ºC por 1 minuto e 30 segundos) e um passo final de extensão a 72ºC por 8 minutos. Para controle, 10 µL do volume da reação foi utilizado na eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v).

Inoculação e extração plasmidial

Com o objetivo de isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes para posterior seqüenciamento foi colocado 1 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina em cada poçinho da microplaca; foram inoculadas colônias individuais com o auxílio de pipeta multicanal. A placa foi selada com adesivo, foram feitos furos em cima com uma agulha para aeração durante o crescimento, foi incubada a 37ºC (shaker) a 300 rpm durante 22h; o adesivo

da placa foi trocado e placa foi centrifugada por 6 minutos a 3000 rpm, para sedimentar as células; foi descartado o sobrenadante e a placa foi mantida invertida sobre papel absorvente por 1 minutos; foi adicionado a cada poçinho 240 µL de solução GTE [Glicose 20%, Tris 1 M (pH 7,4), EDTA 0,5 M (pH 8,0)], a placa foi selada com adesivo e houve a ressuspensão das células agitando-as no vortex por 2 minutos; a placa foi centrifugada por 6 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado; foi adicionado a cada poçinho 80 µL de GTE, a placa foi selada com adesivo para etanol e agitada no vortex por 5 minutos; foi transferido 60 µL de cada suspensão de células para placa com fundo em U contendo 5 µL de RNAse (10 mg/mL); foi adicionado a cada poçinho 60 µL de NaOH 0,2M – SDS 1% (p/v), a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 10 vezes por inversão e incubada 10 minutos à temperatura ambiente; após esse período a placa foi centrifugada brevemente; foi adicionado a cada poçinho 60 µL de KOAc 3 M, a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 10 vezes por inversão, centrifugada brevemente; o adesivo foi removido e a placa incubada em estufa a 90ºC por exatos 30 minutos; a placa foi esfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm; foi fixada com fita adesiva uma placa filtro no topo de uma placa de fundo em U, foi transferido todo o volume para a placa filtro, e centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm, a 20ºC; foi removida a placa filtro e adicionado ao filtrado 110 µL de isopropanol; a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 20 vezes por inversão e centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm a 20ºC; o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e foram adicionados 200 µL de etanol 70% (v/v) gelado; a placa foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm a 20ºC, e o sobrenadante descartado; a placa foi invertida sobre papel absorvente, centrifugada invertida até 600 rpm. A placa secou por 60 minutos à temperatura ambiente e foi ressuspendida em 60 µL de água milliQ (*overnight*).

Seleção dos insertos e seqüenciamento

Este método garante que somente insertos que contenham microssatélites sejam amplificados usando *primer* que se reassocia ao sítio SP6 como à seqüência de microssatélites presente no inserto. A utilização do *primer* SP6 leva à amplificação do sítio inteiro. As reações de seqüenciamento foram realizadas em um termociclador PTC- 200 (MJ Research, Inc.) em um volume final de 10 µL contendo 2,0 µL de tampão Save Money (2,5 µL de $MgCl_2$ 2 M, 200 µL de Tris-HCl 1 M pH 9,0), 0,5 µL de *primer* SP6 (5 pMol/µL), 0,4 µL de Big Dye e de 3 µL de DNA (1µg). Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 96ºC por 2 minutos, seguida de 25 ciclos (96ºC por 45 segundos, 50ºC por 30segundos, 60ºC 4 minutos) e um passo final a 4ºC até retirar a reação da máquina. Para

eliminar possíveis interferentes ou excessos de reagentes da reação de seqüenciamento e deixar as amostras prontas para a eletroforese, foi realizada a purificação das amostras. Foram adicionados nas amostras 80 µL de isopropanol 65% (v/v) e foi agitado suavemente; ficou na bancada por 15 minutos e foi centrifugado a 3000 rpm por 45 minutos; o sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida por 1 minuto em papel absorvente para secar. Foram adicionados 200 µL de etanol 60% (v/v) e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida por 1 minuto em papel absorvente para secar. A lavagem foi repetida. Foi dado um *spin* com placa invertida. A placa ficou no fluxo laminar por 1 hora para secar.

Depois de feita a extração e purificação, a seqüência de cada clone selecionado foi determinada através da análise em um seqüenciador automático modelo ABI 3730 (*Applied Biosystem*).

Análises das seqüências

Os cromatogramas produzidos pelo seqüenciador foram analisados através do programa Chromas 2.21 (Technelysium Pty Ltd). As seqüências foram obtidas através do *3730/3730xl Data Collection Software v3.0 (Applied Biosystems)*, foram processadas com o auxílio do conjunto de *softwares Phred, Consed* e *Cross_Match* (*Laboratory of Phil Green, Genome Sciences Department, University of Washington* – http://www.phrap.org/index.html).

Por meio de ferramentas disponíveis nestes programas foram retiradas das seqüências as regiões correspondentes ao vetor e ao adaptador, restando apenas a seqüência do inserto. Trechos de má qualidade e seqüências cujas bases não puderam ser identificadas com segurança (parâmetro *Phred* > 20), também foram excluídos. Com isso, arquivos do tipo "FASTA" foram obtidos, contendo apenas seqüências de interesse e com boa qualidade. Estas seqüências "FASTA" foram então processadas pelo *software CAP3 Sequence Assembly Program* (HUANG & MADAN, 1999), para identificar "contigs" e "singlets". Para construção dos "contigs" foi necessária uma sobreposição de no mínimo 20 pares de base entre duas seqüências, assim os "contigs" e "singlets" puderam ser analisados pelo programa TROLL (CASTELO & GAO, 2002).

Foram adotados parâmetros para identificação das regiões de interesse, tais como: microssatélites mononucleotídeos deveriam ter no mínimo dez repetições do motivo, dinucleotídeos deveriam ter no mínimo cinco repetições do motivo, microssatélites constituídos por trinucleotídeos deveriam ter no mínimo quatro repetições do motivo, microssatélites constituídos por tetranucleotídeos deveriam ter no mínimo três repetições do

motivo e pentanucleotídoes deveriam ter no mínimo duas repetições do motivo. Em virtude destes parâmetros, algumas seqüências foram excluídas da análise, restando apenas seqüências que continham microssatélites com características desejáveis. A partir daí, os pares de *primers* complementares às seqüências que flanqueiam as ilhas de repetição microssatélites, foram desenhados utilizando o programa TROLL (http://www.bioinformatica.ucb.br/troll.html).

Foram utilizados os critérios estabelecidos pelo programa, como: conteúdo mínimo de 50% e máximo de 60% do motivo microssatélite; diferença de temperatura de reassociação dos *primers* variando entre 55 a 70ºC e diferença de temperatura de reassociação entre os pares de *primers* variando no máximo de 3ºC (CASTELO & GAO, 2002). Para evitar o desenho de pares de *primers* redundantes todas as seqüências obtidas foram alinhadas entre si.

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa de alinhamento múltiplo Clustal X (THOMPSON et al., 1999). Visando facilitar a detecção de polimorfismo, os *primers* foram desenhados, sempre que possível, de forma que o produto de amplificação tenha no mínimo 100 e no máximo 250 pb. As seqüências dos locos polimórficos foram anotadas e submetidas ao GeneBank, com o auxílio da ferramenta Banklt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Banktl).

Para cada par de *primers* desenhados, foram realizadas séries de amplificações visando alcançar as melhores condições para amplificação dos locos. Para as amplificações foi utilizada a enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram padronizadas para cada loco, variando a temperatura de reassociação e as concentrações de $MgCl_2$, DNA molde, dNTP e enzima.

Os *primers* microssatélites obtidos no desenvolvimento desse estudo foram sintetizados por *Gene Link, Inc*.

3.2.4. Avaliação do polimorfismo

A avaliação de polimorfismo foi feita com três isolados objetivando-se pelo menos oito locos microssatélites polimórficos para a espécie estudada. Os locos selecionados foram utilizados para a genotipagem dos treze isolados de *C. fimbriata*, visando a caracterização da coleção do IAC.

3.2.5. Caracterização de Marcadores Microssatélites

Para este trabalho foram testados 22 de pares de *primers* para a genotipagem da espécie. Uma reação de PCR foi realizada para os 22 locos microssatélites, com um volume final de 20 μL contendo 25 ηg do DNA; 0,50 μL do *primer* direto (10 μM) e 0,50 μL do *primer* reverso (10 μM); 1,6 μL de dNTP [250 μM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato]; 2,0 μL solução tampão 10x (50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 0,80 μL de $MgCl_2$ (25 mM) e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Para os 22 locos estudados, o ciclo total das amplificações foi realizado em um termociclador da Bio-Rad (My Cycler) programado para iniciar com 2 minutos a 96ºC para uma desnaturação inicial, seguido por 33 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 94ºC; 1 minuto de anelamento com temperaturas variando conforme a tabela 12 (que está disponível em Resultados); 1 minuto de extensão a 72ºC e finalizando com 7 minutos a 72ºC para extensão final.

Os produtos de amplificação foram separados sob condições desnaturantes em gel 7% de poliacrilamida (v/v), por cerca de 4 horas a 70 Watts de potência. Um marcador de alelo foi usado como padrões de tamanho de DNA em escala de 10 pb (Invitrogen). Após a amplificação, o gel foi corado com nitrato de prata (MERRIL et al., 1981), com as modificações propostas por CRESTE et al. (2001).

3.2.6. Metodologia de análise estatística dos dados

As freqüências gênicas ou alélicas e genotípicas em cada loco foram obtidas a partir da leitura dos dados nos géis de poliacrilamida.

Após a leitura dos géis, as freqüências alélicas, o número de alelos por loco (A), a heterozigozidade observada (H_O) e esperada (H_E) foram estimadas utilizando o programa GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2000).

A caracterização e estruturação da variabilidade genética foram visualizadas através de dendrogramas construídos pela matriz de distâncias genéticas de Rogers-W (1978) e pelo critério de agrupamento UPGMA, e para isto utilizaram-se os programas NTSYS (ROHLF, 1989) e TFPGA (MILLER, 1997).

A estabilidade ou consistência destes agrupamentos foi testada através do procedimento de reamostragens aleatórias, com 10.000 *bootstraps,* através do programa BooD (COELHO, 2001).

O programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado com a finalidade de ser estimada a estrutura do germoplasma. Foram testadas as probabilidades de 01 a 20

agrupamentos (K=1 a K=20), segundos os parâmetros: 300000 burning (rodar tempo suficiente para garantir que valores finais sejam independentes dos iniciais, e do número de interações) e 500000 MCMC (rodar simulações independentes para verificar convergência), sendo feitas cinco iterações para cada K. Utilizou-se o modelo "no admixture" com freqüências alélicas não correlacionadas, pois se trata de uma coleção. A escolha do valor de K que melhor agrupasse os acessos foi feita com base em PRITCHARD et al. (2000), isto é, com base no logaritmo da probabilidade de cada K.

4. RESULTADOS

4.1. Material Vegetal - *Mangifera Indica*

4.1.1. – Marcadores Microssatélites

Entre as 90 amostras de DNA, apenas 84 apresentavam DNA em quantidades suficientes ou de boa qualidade para as amplificações. Portanto, foram utilizados apenas 84 acessos na caracterização do banco de germoplasma (Tabela 07).

A extração do DNA genômico a partir de 500 mg do material vegetal dos genótipos de *M. indica* forneceu uma concentração de aproximada de 100 ηg/μL.

Tabela 07: Listagem dos 84 indivíduos utilizados na genotipagem para os marcadores SSRs.

COLEÇÃO MANGA - APTA / Votuporanga

ID	Nomes	ID	Nomes
4	Extrema	21	Falsa Haden
5	Itamaracá - Canteiro de frutas Votuporanga	22	Ouroporanga
6	Azenha - Valinhos - SP	23	Bourbon Votuporanga
7	Imperial de Piracicaba Dr. Julio	24	Boarolo
8	Rosa Estrada - Votuporanga	25	Santa Maria
9	Manga Preta - São Gonçalo - RJ	26	Coração de Boi 2
10	Manga Verde - São Gonçalo - RJ	27	Coração de Boi 1
11	Sabina	28	Ubá Viçosa 1 (Rogério)
12	Winter	29	Ubá Viçosa 2 (Rogério)
14	São Quirino	30	Mamão Bahia (Itiuba)
15	IAC 101 Ourinho	31	Tommy Atkins
16	Espadona Stahl (vargen de Espada Stahl)	32	Van Dyke
17	F1 (sensation x) suscetível a mosca	33	Boubon Vermelha
18	Keitt Pequena (Mogi)	34	Ubá Votuporanga
19	Bourbon Tupã	35	Ubá Paracatu
20	Berton	36	Espada Itápolis (planta 2)

Continua...

Tabela 07:...*Continuação*

ID	Nomes	ID	Nomes
37	Beta	64	Pêssego
38	Dona Maria	65	IAC 112
39	IAC 107 Castro	66	Espada Ouro de Itaparica
40	Votupa	67	Nogueira
41	Kent	68	Rosa de Santo Antão (Pernambuco)
43	Haden 2H (clone do IAC)	69	Neldica
44	IAC 106 Jasmin	70	Heidi
45	Mallika	71	Joa
46	Itamaracá	72	IAC 111
47	IAC 106 Jasmin	73	Rosa de Campinas
48	Fafá	74	Rosa de Tanabi
49	Kilo	75	Pico
50	Espada Vermelha	76	Sensation
51	IAC 104 Dura	77	Lira
52	Coração de Boi (Jaidenópolis)	78	Monzanillo
53	IAC 102 Touro	79	Espada de Itápolis (planta 1)
54	IAC 100 Bourbon	80	Roxa
55	IAC 105 Palmera	81	Alfa
56	Irwin	82	Palmer
57	Tinfan	83	Ataulfo
58	Coração de Boi Stein	84	Surpresa
59	Ômega	85	Parvin
60	Manila (Carabao)	86	Espada Stahl
61	Natalina	88	Rosinha Nhandeara
62	Lolita	89	Itamaracá Nhandeara
63	Bourbon Nogueira	90	Juliana

4.1.2. Utilização de *Primers* Microssatélites

Para a genotipagem foram sintetizados os 34 *primers* descritos anteriormente. Foram utilizados para caracterização genética, 23 pares de *primers* polimórficos (Tabela 08).

Inicialmente, todos os *primers* formam submetidos ao programa básico com 60ºC para a reassociação do *primer* e todos os *primers* amplificaram satisfatoriamente.

Para os *primers* MIAC05, mMiCIR08, mMiCIR11, mMiCIR13, mMiCIR20, mMiCIR22 e mMiCIR27 a melhor amplificação, ocorreu na reação de PCR número dois. Para os demais pares de *primers* foram utilizadas as reações de PCR número 01 (tabela 03).

Na tabela 08 são apresentadas as condições de amplificação utilizadas para os 23 locos de microssatélites avaliados e suas respectivas amplitudes alélicas. A maior amplitude alélica observada foi de 320 pares de bases.

Tabela 08: Seqüências dos pares de *primers* de *M. indica* que amplificaram 23 locos microssatélites, em 84 acessos de *M. indica,* com seus respectivos motivos, amplitudes alélicas, número de alelos, heterozigosidades observadas e esperadas, temperatura de anelamento, P valor (EHW) e número de acesso no Genbank.

primers	Acessos do Genbank	Seqüências de *primers* (5' 3')	Motivos	Ta (°C)	Amplitude alélica (bp)	A*	He	Ho	P valor (EHW)
M IAC02	AB190345	F: GCTTTATCCACATCAATATCC	(TA)2(CA)10TA(CA)3TA(CA)4	60	140 - 180	25,0	0,9482	0,6849	0,0000*
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATTCCTACAATAACTTGCC							
MIAC04	AB190347	F: CGTCATCCTTTACAGCGAACT	(AC)10	60	110 - 130	18,0	0,9286	0,8955	0,5825
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATCATCTTTGATCATCCGAAAC							
MIAC05	AB190348	F: AATTATCCTATCCCTCGTATC	(ACACACAT)3(ACACACACAT)3	60	130 - 190	24,0	0,9307	0,9178	1,0000
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATAGAAACATGATGTGAACC							
MIAC06	AB190349	F: CGCTCTGTGAGAATCAAATGGT	(AT)14(GT)18	60	270 - 290	7,0	0,6911	0,1355	0,0000*
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTGGACTCTTATTAGCCAATGGGATG							
MIAC11	AB190350	F: GTGCGAGGAGATATCTGT	(CT)5(CA)6	60	110 - 140	21,0	0,9332	0,8461	0,2199
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATCTGGTTCTTCATTGTTGAGATG							
mMiCIR03	AJ635165	F: GATGAAACCAAAGAAGTCA	(TG)10	60	250 - 270	2,0	0,2353	0,1081	0,0001*
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTCCAATAAGAACTCCAACC							
mMiCIR04	AJ635166	F: CTTGAAAGAGATTGAGATTG	(GT)8	60	215 - 240	5,0	0,6251	0,8472	0,0000*
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTAGAAGGCAGAAGGTTTAG							
mMiCIR08	AJ635170	F: GACCCAACAAATCCAA	(AT)6G(TG)14(TATG)6	60	160 - 190	4,0	0,6085	0,2083	0,0000*
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATACTGTGCAAACCAAAAG							
mMiCIR10	AJ635172	F: TAGGGATATAGCTGGAGG	(TG)13	60	300 - 320	4,0	0,5931	0,4594	0,1049
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTACGCAGTAGAACCTGTG							
mMiCIR11	AJ635173	F: CAGCCTTATGTGTTGAAG	(TG)10	60	210 - 230	3,0	0,6063	0,2238	0,0000*
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATAAACTAAACAAGCTGAACC							
mMiCIR12	AJ635174	F: CTTCATTTCTCCACTTTTG	(TG)8	60	240 - 250	2,0	0,5034	0,5352	0,6370
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTATGAAATACTGGCTGGTT							
mMiCIR13	AJ635175	F: GCGTAAAGCTGTTGACTA	(GT)10	60	160 - 180	3,0	0,2724	0,1186	0,0000*
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATTCATCTCCCTCAGAACA							
mMiCIR14	AJ635176	F: GAGGAACATAAAGATGGTG	(TG)11	60	150 - 175	14,0	0,7916	0,4027	0,0000*
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATGACAAGATAAACAACTGGAA							
mMiCIR16	AJ635178	F: TAGCTGTTTTGGCCTT	(AT)6	60	260 - 280	2,0	0,0529	0	0,0001*
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTATGTGGTTTGTTGCTTC							
mMiCIR18	AJ635180	F: CCTCAATCTCACTCAACA	(AC)8	60	230 - 245	5,0	0,7272	0,6617	0,7978
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTACCCCACAATCAAACTAC							

Continua...

Tabela 08:... *Continuação*

primers	Acessos do Genbank	Seqüências de *primers* (5' 3')	Motivos	Ta (°C)	Amplitude alélica (bp)	A*	He	Ho	P valor (EHW)
mMiCIR20	AJ635182	F: GACTTGCAGTTTCCTTTT	(AC)14	60	80 - 100	20,0	0,8947	0,7377	0,4517
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATTCAAGAACCCCATTTG							
mMiCIR22	AJ635184	F: TGTCTACCATCAAGTTCG	(AC)16	60	170 - 190	4,0	0,7421	0,8518	0,7734
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATGCTGTTGTTGCTTTACTG							
mMiCIR25	AJ635187	F: ATCCCCAGTAGCTTTGT	(CA)6	60	230 - 250	8,0	0,7867	0,8387	0,5798
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTTGAGAGTTGGCAGTGTT							
mMiCIR27	AJ635189	F: ACGGTTTGAAGGTTTTAC	(TTCA)4TTCCCGTATCTGAATACA(AC)6	60	170 - 180	2,0	0,1665	0,0606	0,0002*
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATATCCAAGTTTCCTACTCCT							
mMiCIR28	AJ635190	F: AAGAGGGAATCTTAATCAAC	(CA)7	60	220 - 230	2,0	0,4461	0,2	0,0000*
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATGTCGTTTTGCGTTAGTG							
mMiCIR32	AJ938177	F: TCATTGCTGTCCCTTTTC	(TG)19	60	170 - 190	4,0	0,4449	0,4242	0,7641
		R: GACTATGGGCGTGAGTGCATATCGCTCAAACAATCC							
mMiCIR34	AJ938179	F: TCGGTCATTTACACCTCT	(AATA)3(AC)8	60	210 - 230	5,0	0,7524	1,00	0,0000*
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTTTATTGAGCTTCTTTGTGTT							
mMiCIR36	AJ938181	F: ACCACGAAAAGACAACTC	(TG)11	60	240 - 260	4,0	0,23	0,169	0,0090
		R: ACCAACCTAGGAAACACAGTTCATCTTTGTTAAATAGGTTAAT							
Média						**8,2**	**0,605**	**0,4925**	

A*: número de alelos; He e Ho: heterozigosidades esperada e observada, respectivamente; Ta (°C): temperatura de anelamento; P valor * significativo para EHW $p < 0,05$ depois de correção por BONFERRONI.

4.1.3 Caracterização da Variação Genética utilizando Marcadores SSRs

O número médio de alelos por loco foi de 8,2, variando no mínimo de 02 alelos (loco mMiCIR03, mMiCIR12, mMiCIR16, mMiCIR27, mMiCIR28) ao máximo de 25 alelos (loco MIAC02), como se pode observar na tabela 08.

Na tabela 08 pode-se verificar a maior e a menor heterozigosidade observada e esperada nos locos. O loco mMiCIR34 apresentou a maior heterozigosidade observada (1,0) e o loco mMiCIR27 a menor (0,0606). A heterozigosidade esperada variou de 0,9482 a 0,0529 (loco MIAC02 e loco mMiCIR16 respectivamente).

Observando as heterozigosidades juntamente com o teste exato de Fisher verificou-se que as populações não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas como é uma coleção, isto já era esperado.

4.1.4. Estrutura Genética utilizando Marcadores SSRs

As distâncias genéticas de Rogers-W (1978) calculadas, variaram de 0,0 a 0,8660. Com base na distância estimada observa-se que os indivíduos 06 e 09; 16 e 17 são os mais similares (0,0) e os indivíduos 73 e 75; 83 e 23 são os mais divergentes (0,8660). Conforme dendograma apresentado na figura 05. A respectiva matriz de distância está apresentada em anexo.

O programa STRUCTURE agrupou melhor os acessos em três grupos (K=3), uma vez que com K=3 foram obtidas as maiores probabilidades. Este agrupamento é apresentado na Figura 06.

4.1.5. Marcadores ISSRs

Foram utilizados apenas 65 acessos na caracterização do banco de germoplasma (Tabela 09).

A extração do DNA genômico a partir de 500 mg do material vegetal de um genótipo de *M. indica* forneceu uma concentração de aproximada de 80 ηg/μL.

4.1.6. Utilização de *Primers* ISSRs

Para a genotipagem foram sintetizados os 15 *primers* descritos anteriormente. Foram utilizados para caracterização genética, 12 pares de *primers* polimórficos (Tabela 10).

Inicialmente, todos os *primers* foram submetidos ao programa básico com 50ºC para a reassociação do *primer* e todos os *primers* amplificaram satisfatoriamente.

Para os *primers* MAO, 844 e 7.1 a melhor amplificação, ocorreu na reação de PCR número 1. Para os demais *primers* foram utilizadas as reações de PCR número 2 (tabela 05).

Na tabela 10 são apresentadas as condições de amplificação utilizadas para os 12 locos de ISSRs avaliados.

4.1.7. Estrutura Genética utilizando Marcadores ISSRs

A porcentagem de bandas polimórficas obtidas foi de 67,9%, conforme tabela 10.

O programa STRUCTURE agrupou melhor os acessos em três grupos (K=3), uma vez que com K=3 foram obtidas as maiores probabilidades. Este agrupamento é apresentado na Figura 07.

O dendograma obtido é apresentado na figura 08.

A Figura 09 apresenta a variabilidade alélica existente no loco 18.

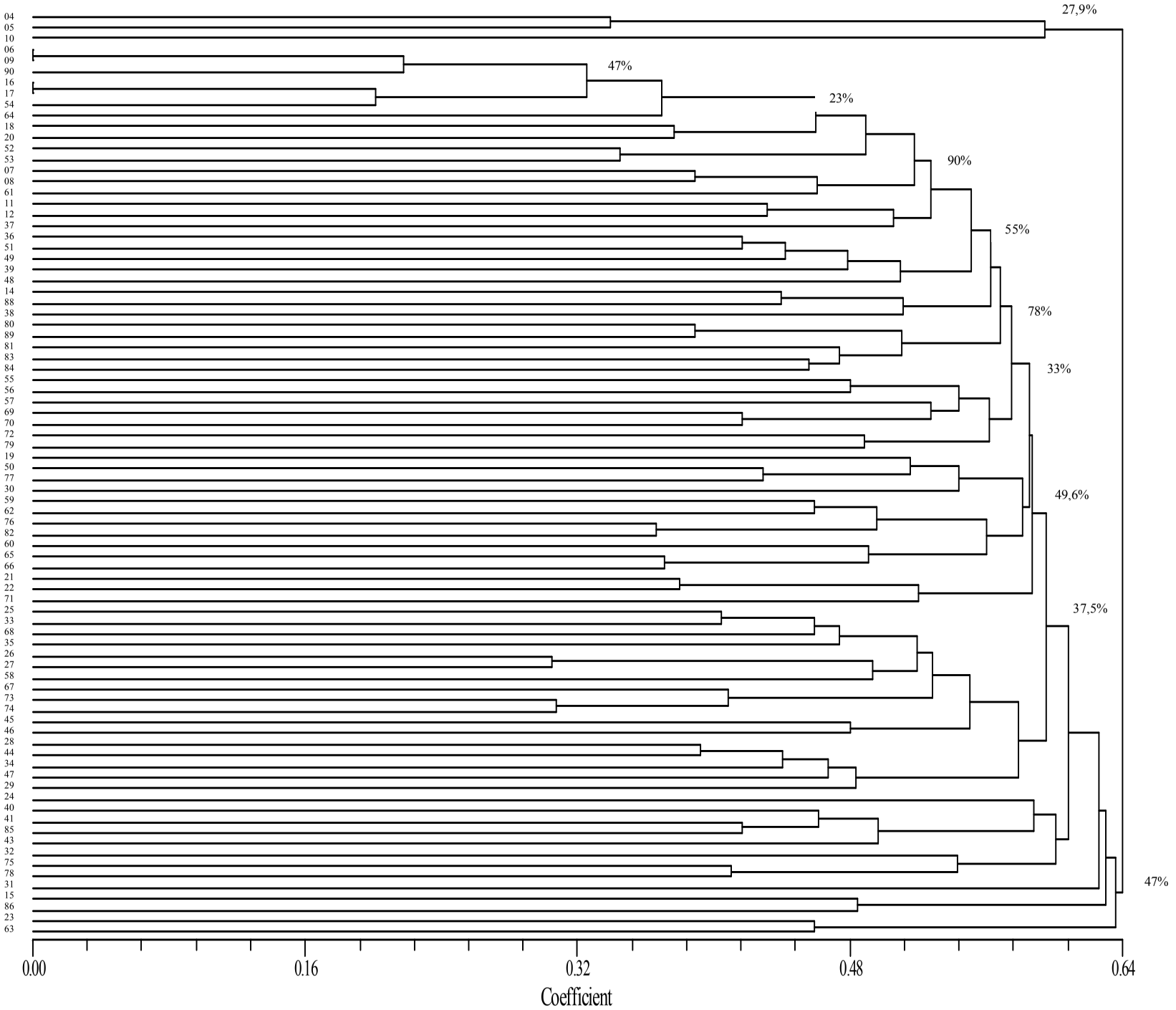

Figura 05: Dendrograma baseado na matriz de distância genética de Rogers-W obtido para as 84 amostras do banco de germoplasma de APTA / Votuporanga de *M. indica*. Na vertical estão as amostras e na horizontal o nível de similaridade. As porcentagens junto aos "nós" representam sua estabilidade, testada através de 10000 reamostragens *bootstraps.*

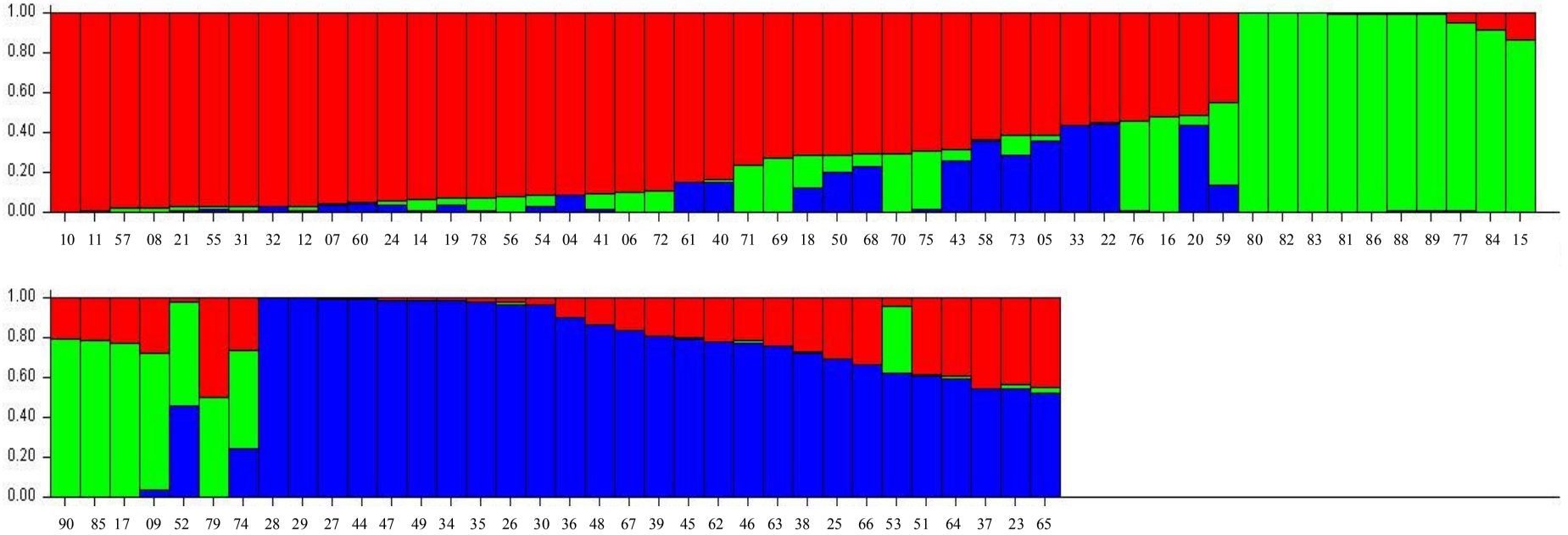

Figura 06: Arranjo das amostras em 3 grupos (K=3) realizado pelo programa STRUCTURE utilizando o marcador microssatélite. Na horizontal estão apresentados os acessos de *M. indica*, e na vertical o nível de estruturação. Amostras com a mesma cor pertencem ao mesmo grupo.

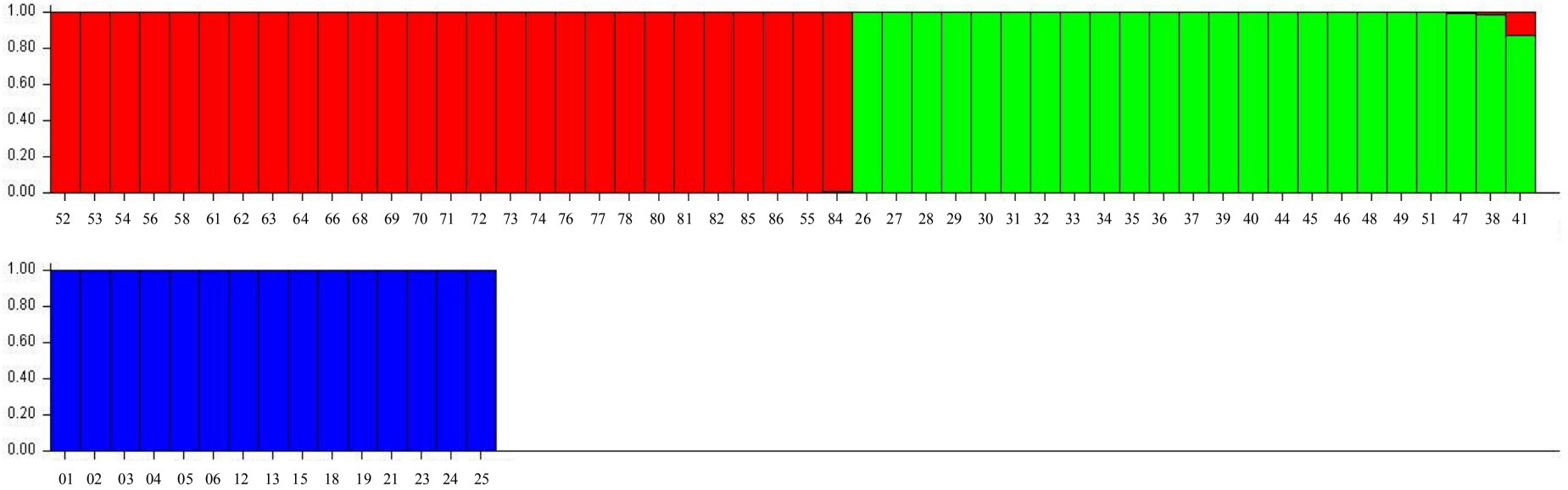

Figura 07: Arranjo das amostras em 3 grupos (K=3) realizado pelo programa STRUCTURE utilizando o marcador ISSR. Na horizontal estão apresentados os acessos de *M. indica*, e na vertical o nível de estruturação. Amostras com a mesma cor pertencem ao mesmo grupo.

Tabela 09: Listagem dos 65 indivíduos utilizados na genotipagem para os marcadores ISSRs.

COLEÇÃO MANGA - APTA / Votuporanga

ID	Nomes	ID	Nomes
1	Itamaracá - Votuporanga	45	Mallika
2	Carlotinha	46	Itamaracá
3	Itamaracá Cardoso	47	IAC 106 Jasmin
4	Extrema	48	Fafá
5	Itamaracá - Canteiro de frutas Votuporanga	49	Kilo
6	Azenha - Valinhos - SP	51	IAC 104 Dura
12	Winter	52	Coração de Boi (Jaidenópolis)
13	Rosa do Vila	53	IAC 102 Touro
15	IAC 101 Ourinho	54	IAC 100 Bourbon
18	Keitt Pequena (Mogi)	55	IAC 105 Palmera
19	Bourbon Tupã	56	Irwin
21	Falsa Haden	58	Coração de Boi Stein
22	Ouroporanga	61	Natalina
23	Bourbon Votuporanga	62	Lolita
24	Boarolo	63	Bourbon Nogueira
25	Santa Maria	64	Pêssego
26	Coração de Boi 2	66	Espada Ouro de Itaparica
27	Coração de Boi 1	68	Rosa de Santo Antão (Pernambuco)
28	Ubá Viçosa 1 (Rogério)	69	Neldica
29	Ubá Viçosa 2 (Rogério)	70	Heidi
30	Mamão Bahia (Itiuba)	71	Joa
31	Tommy Atkins	72	IAC 111
32	Van Dyke	73	Rosa de Campinas
33	Boubon Vermelha	74	Rosa de Tanabi
34	Ubá Votuporanga	76	Sensation
35	Ubá Paracatu	77	Lira
36	Espada Itápolis (planta 2)	78	Monzanillo
37	Beta	80	Roxa
38	Dona Maria	81	Alfa
39	IAC 107 Castro	82	Palmer
40	Votupa	84	Surpresa
41	Kent	85	Parvin
44	IAC 106 Jasmin	86	Espada Stahl

Tabela 10: Seqüências dos pares de *primers* de *M. indica* que amplificaram 12 locos ISSRs, em 84 acessos de *M. indica*, com suas respectivas bandas polimórficas e número total de bandas.

primers	Seqüências de *primers* (5' 3')	Motivos	Ta (˚C)	Amplitude alélica (bp)	Número de bandas polimórficas	Número total de bandas
+1	AGAGAGAGAGAGAGAGAG	(AG)9	50	500 - 1000	5	7
+4	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	(GA)10	50	400 - 1200	10	15
+5	CAGCAGCAGCAGCAG	(CAG)5	50	400 - 800	6	10
+7.2	GTGGTGGTGGTGGTG	(GTG)5	50	400 - 1200	10	15
*7.1	CTCTCTCTCTCTCTCTAG	(CT)8 - RG	50	350 - 1100	11	15
+12	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	(GA)9 - C	50	350 - 1000	8	16
+13	GACAGACAGACAGACA	(GACA)4	50	900 - 1800	9	15
+14	GGATGGATGGATGGAT	(GGAT)4	50	700 - 1500	8	10
+17	GTGGTGGTGGTG	(GTG)4	50	400 - 1500	11	14
+18	GAGAGAGAGAGAGAGAGAT	(GA)9-T	50	400 - 1100	9	12
*MAO	CTCCTCCTCCTCAC	(CTC)4 - RC	50	250 - 1500	14	20
*844	CTCTCTCTCTCTCTCTAC	(CT)8 - RC	50	450 - 1100	9	13

Ta (°C): temperatura de anelamento.

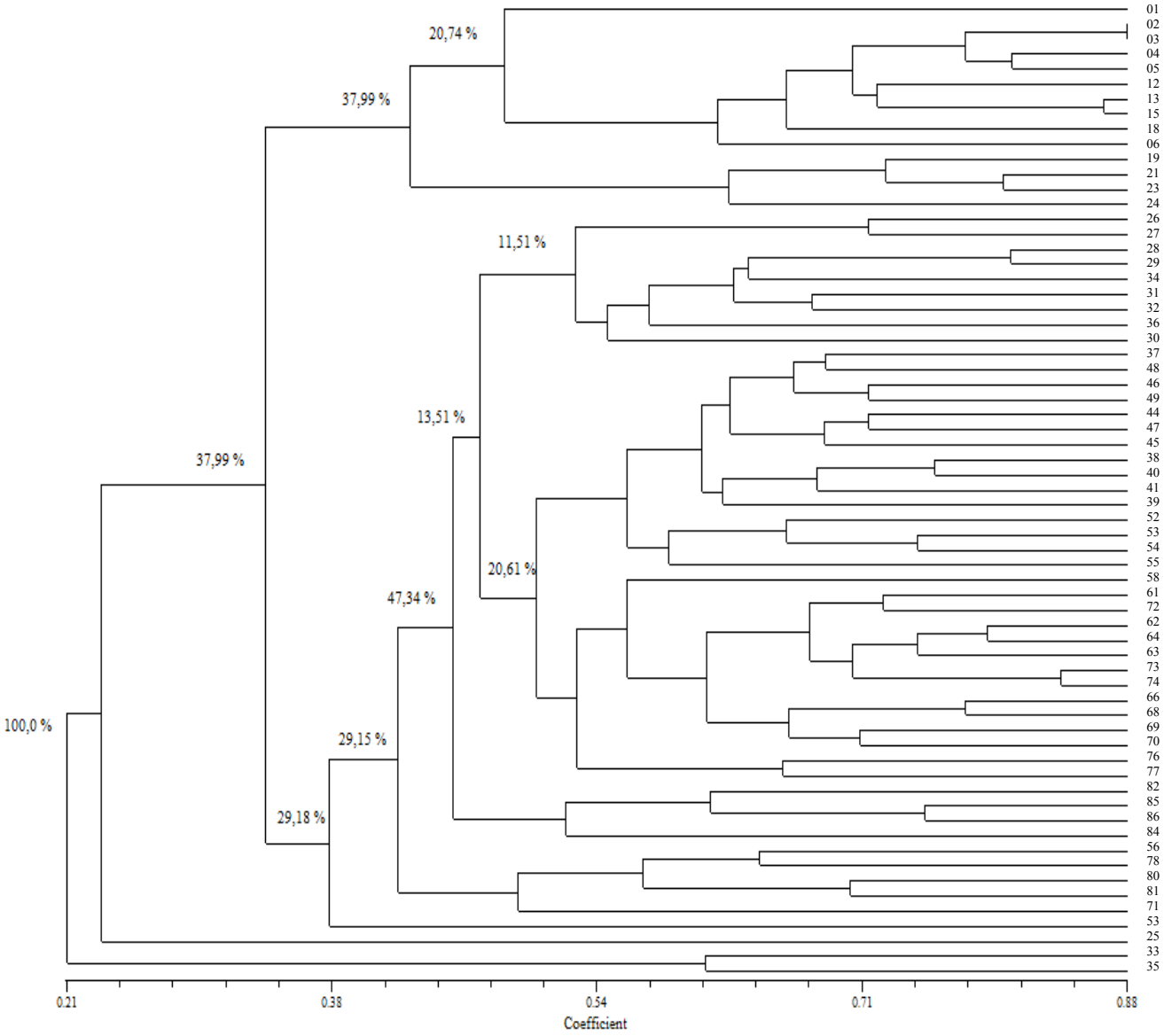

Figura 08: Dendrograma baseado no índice de similaridade de Jaccard obtido para as 65 amostras do banco de germoplasma da APTA / Votuporanga de *M. indica*. Na vertical estão amostras e na horizontal o nível de similaridade. As porcentagens junto aos "nós" representam sua estabilidade, testada através de 10000 reamostragens *bootstraps.*

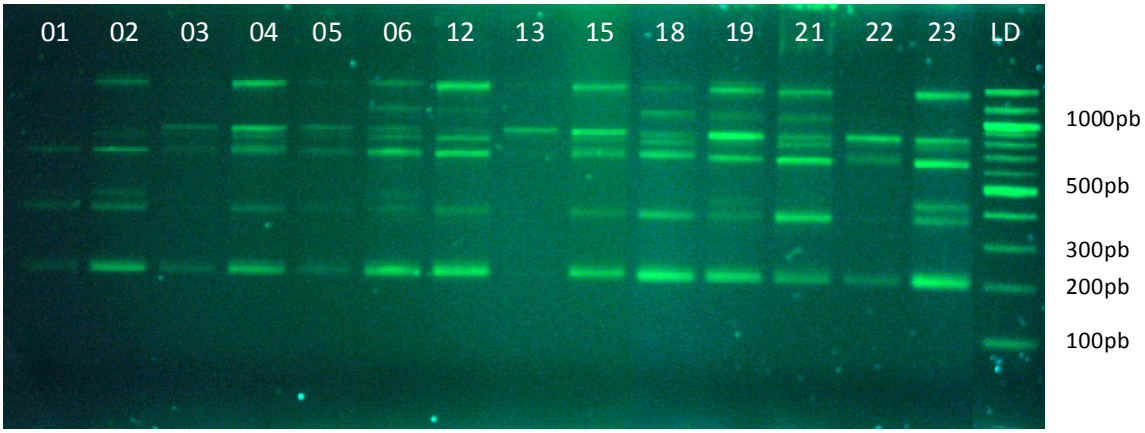

Figura 09: Perfil de gel de ISSRs, utilizando o *primer* 18 de 14 genótipos de *M. indica.*

4.2. Material microbiológico - *Ceratocystis Fimbriata*

As 13 amostras de DNA apresentavam quantidade suficiente ou de boa qualidade para as amplificações. Portanto, foram utilizados todos os acessos na caracterização da coleção dos isolados.

4.2.1 Desenvolvimento de Bibliotecas Enriquecidas com Locos Microssatélites

A extração do DNA genômico a partir de 500 mg do material vegetal de um genótipo de *C. fimbriata* forneceu uma concentração de aproximadamente 100 ηg/μL e foram utilizados 6 ηg na reação. Na digestão com a enzima *RsaI* o DNA genômico foi digerido não gerando nenhum tamanho preferencial de fragmento e produzindo o perfil adequado para a construção da biblioteca. A ligação dos adaptadores foi importante para garantir que cada fragmento tivesse uma terminação comum e conhecida A préamplificação foi realizada com sucesso, confirmando a ligação dos adaptadores aos fragmentos e gerando uma maior quantidade de DNA para a seleção. Não houve a amplificação aparente de fragmentos preferenciais, o que poderia ser prejudicial nas próximas etapas, levando a clonagem e seqüenciamento de fragmentos preferenciais, aumentando o tempo e os custos para a identificação de microssatélites não redundantes.

A eficácia do enriquecimento foi verificada através dos produtos de PCR obtidos diretamente de colônias individuais e foi confirmada com a técnica de seqüenciamento. Cerca de 88,78% dos clones analisados apresentaram presença de regiões microssatélites, sendo que muitas das seqüências apresentavam mais de uma região microssatélite.

4.2.1.1 Análise das Seqüências

Através de uma interface web o programa TROLL localizou, nos 196 insertos seqüenciados, 174 que possuíam pelo menos um microssatélite. Nestas 174 seqüências foram encontradas um total de 303 motivos microssatélites, sendo 135 motivos dinucleotídeos, 2 motivos trinucleotídeos, 6 motivos tetranucleotídeos e 160 motivos pentanucleotídeos. Foram usados critérios estabelecidos pelo programa para localizar as regiões de elementos repetitivos

4.2.1.2 Desenvolvimento de *Primers*

Todas as seqüências obtidas foram alinhadas entre si e cerca de 5% apresentaram redundância, as que eram complementares foram excluídas. Destas, 22 seqüências puderam ser utilizadas para o desenho de *primers* complementares às regiões franqueadoras dos microssatélites. As seqüências restantes não foram utilizadas, pois a região franqueadora era também um microssatélite ou estava muito próximo de uma das extremidades da seqüência impossibilitando o desenho dos *primers*. Dentre as 22 seqüências escolhidas para o desenho de *primers* estão presentes duas classificações diferentes para os dois motivos existentes (Tabela 11).

Nos 22 *primers* desenhados, os motivos microssatélites foram classificados em 21 dinucleotídeos e apenas um (C.fim 10), tetranucleotídeos. A figura 10 apresenta a porcentagem de motivos microssatélites perfeitos, compostos para os 22 *primer* desenhados.

Os motivos microssatélites mais freqüentes encontrados nos 22 *primers* desenhados foram os dinucleotídeos TG e AC, outros motivos apareceram em menor porcentagem e estão representados na figura 11.

Tabela 11: *Primers* construídos a partir das seqüências microssatélites.

primers	**Seqüências de *primers* (5' 3')**	**Motivos**	**Ta (˚C)**	**Produto (bp)**	**Classificação**
C. fim 01	F: TTGGGAATGGGAGTCTTTTG R: CCAGAGGTGTGTTGCTGTGT	$(AC)_{14}$	60	195	Perfeito
C. fim 02	F: TAACAGCCTGGTGATGAACG R: GGGCTCGCTCATTTACCTAT	$(TG)_{18}$	60	175	Perfeito
C. fim 03	F: AGCGACAGAGAGTTGCTTGA R: ACTCAGAGAAATGCGGGAGA	$(AC)_{9}$	60	209	Perfeito
C. fim 04	F: CTTGTTTGATGGACGTGAGC R: TCTCCTCTCCTCCCTGTCTG	$(GT)_{8}$	62	241	Perfeito
C. fim 05	F: GAGGGGCTCGCTCATTTAC R: GAGCACCAACAATGGGATG	$(AC)_{14}$	59	151	Perfeito
C. fim 06	F: TGCAGCAAGAAGATGTGACC R: GACACGACAGCGATCATCA	$(TG)_{11}$	59	196	Perfeito
C. fim 07	F: CGCTCAAGCAGTACATTCCT R: GACACGACAGCGATCATCA	$(AC)_{13}$	61	176	Perfeito
C. fim 08	F: GAGAAGAGGGAACAGGAGGA R: GACGGAGCACCAACCATT	$(CA)_{15}$	59	173	Perfeito
C. fim 09	F: CCCTAATCGCCTCACTTCTC R: GGGGGAGAGATAAGCAACAG	$(AC)_{17}$	62	219	Perfeito
C. fim 10	F: GCCTCGCTGAGAGTCTTGA R: GGTTGATAGGGTCGGAGTCA	$(CACT)_{6}$	61	174	Perfeito
C. fim 11	F: CCTCGCAACTACTGTTTGGTC R: GCGACGCATTAGAAGTAGACA	$(CA)9(CT)_{7}$	61	168	Composto
C. fim 12	F: CAACATCAAGCAGCACCAA R: GGGGAGCAATGAGAGATGA	(CA)11(AT)6	58	150	Composto
C. fim 13	F: TGCCAACAAGAGAAGACTGC R: GCTCAAGCCATCAGAGTGTG	$(AC)_{14}$	61	235	Perfeito
C. fim 14	F: CGAATGGGAGTCTTTTGGAG R: TGACGAACGAACGAACGA	$(AC)_{11}$	58	247	Perfeito

Continua...

Tabela 11: ...*Continuação*

C. fim 15	F: AAGCGGTCAAGGTTTGGTT R: CAAAAGTTGGGGTTCGGTA	$(CA)_{14}$	56	234	Perfeito
C. fim 16	F: TTGGTGACCTGCGAGTTTC R: TGTCCCCTTCTCTCATCTTGA	$(AC)_{21}$	60	153	Perfeito
C. fim 17	F: TCGCCATCTTCTCTGCATAC R: TAGTGACGGAGTTGGAGACG	$(AC)_{17}$	61	156	Perfeito
C. fim 18	F: CTCTTTTGTCCCCTTCTCTCA R: ACTTGGTGACCTGCGAGTTT	$(TG)_{16}$	61	151	Perfeito
C. fim 19	F: AGATGAGCAAGCGATATTTCC R: CCGAGGACTGGGCTATCTAC	$(AC)_{13}$	62	214	Perfeito
C. fim 20	F: TCGCAAGTCTCTCTTATGCTTC R: AGACGGCTCTTTAACAGGACA	$(CT)_{17}$	63	165	Perfeito
C. fim 21	F: GCAGCAAAGAAGATGTGACCT R: GAACAGCGATTCATCACGAC	$(TG)_{10}$	61	221	Perfeito
C. fim 22	F: CAGTCTGCGATGCCATACA R: GATTTGTTGGGCGGACAT	(AC)7	60	172	Perfeito

pb = pares de bases ; TaºC = temperatura de reassociação em ºC.

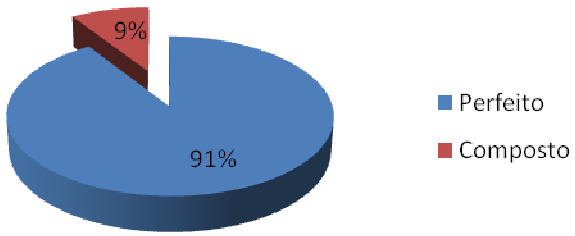

Figura 10: Freqüência de motivos microssatélites perfeitos, compostos e compostos interrompidos de *C. fimbriata*.

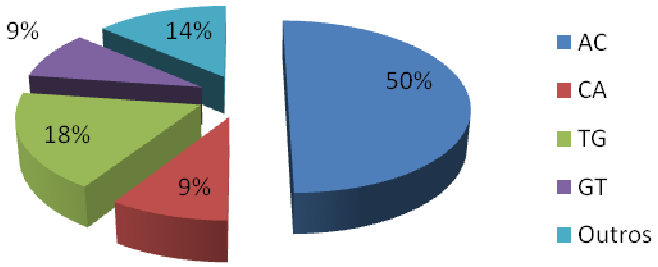

Figura 11: Motivos microssatélites mais freqüentes em *C. fimbriata*.

4.2.1.3 Utilização de *Primers*

Para a genotipagem foram sintetizados todos os *primers* desenhados. Foram utilizados para caracterização genética e estudo da estrutura genética populacional, 20 pares de *primers* polimórficos.

Inicialmente, todos os *primers* formam submetidos ao programa básico com 60ºC para a reassociação do *primer*. Aqueles que não amplificaram satisfatoriamente foram submetidos a ciclos de amplificação com temperaturas de reassociação mais baixas ou mais alta.

Na tabela 12 são apresentadas as condições de amplificação utilizadas para os 20 locos de microssatélites avaliados e suas respectivas amplitudes alélicas. A maior amplitude alélica observada foi de 204 pares de bases.

4.2.2 Caracterização da Variação Genética

O número médio de alelos por loco foi de 6,65, variando no mínimo de 02 alelos (loco C. fim 06) ao máximo de 13 alelos (loco C. fim 19), como se pode observar na tabela 12. Na tabela 12 pode-se verificar a maior e a menor heterozigosidade observada e esperada nos locos. O loco C. fim 09 apresentou a maior heterozigosidade esperada (0,931) e o loco C. fim 08 a menor (0,520). A heterozigosidade observada variou de zero a um (ex. loco 01 e loco 02 respectivamente).

A Figura 12 apresenta a variabilidade alélica existente no loco C. fim 02.

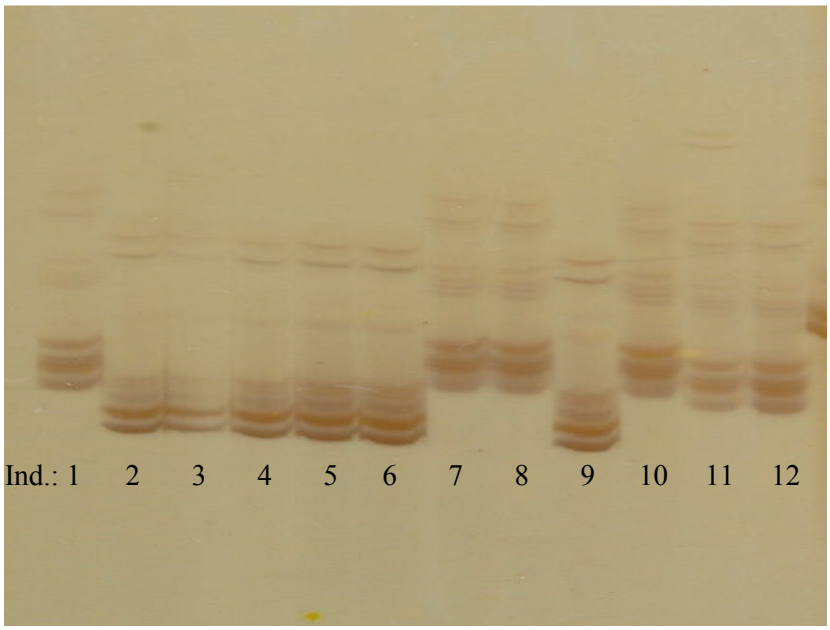

Figura 12: Perfil de gel de microssatélites, utilizando o *primer* C. fim 02 de 12 genótipos de *C. fimbriata*.

Observando as heterozigosidades juntamente com o teste exato de Fisher verificou-se que cinco dos vinte locos não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas como é uma coleção, isto é esperado.

Tabela 12: Seqüências dos pares de *primers* desenvolvidos para *C. fimbriata* que amplificaram 20 locos microssatélites, em 13 acessos de *C. fimbriata,*com seus respectivos motivos, amplitudes alélicas, número de alelos, heterozigosidades observadas e esperadas, temperatura de anelamento, conteúdo do índice de polimorfismo, P valor (EHW) e número de acesso no Genbank.

primers	Acessos do Genbank	Seqüências dos pares de *primers*	Motivos	Ta (˚C)	Amplitude alélica (bp)	A*	Ho	He	PIC	P valor (EHW)
C. fim 01	GF100701	F: TTGGGAATGGGAGTCTTTTG R: CCAGAGGTGTGTTGCTGTGT	$(AC)_{14}$	60	160 - 166	4,0	0,000	0,578	0,5059	0,0002*
C. fim 02	GF100702	F: TAACAGCCTGGTGATGAACG R: GGGCTCGCTCATTTACCTAT	$(TG)_{18}$	60	144 - 158	9,0	1,000	0,833	0,7762	0,4874
C. fim 03	GF100703	F: AGCGACAGAGAGTTGCTTGA R: ACTCAGAGAAATGCGGGAGA	$(AC)_{9}$	60	158 - 178	9,0	0,846	0,870	0,8205	0,5079
C. fim 04	GF100704	F: CTTGTTTGATGGACGTGAGC R: TCTCCTCTCCTCCCTGTCTG	$(GT)_{8}$	62	140 - 152	6,0	0,000	0,763	0,6951	0,0002*
C. fim 05	GF100705	F: GAGGGGCTCGCTCATTTAC R: GAGCACCAACAATGGGATG	$(AC)_{14}$	59	70 - 98	10,0	1,000	0,867	0,8154	0,2443
C. fim 06	GF100706	F: TGCAGCAAGAAGATGTGACC R: GACACGACAGCGATCATCA	$(TG)_{11}$	59	48 - 50	2,0	1,000	0,545	0,375	0,0909
C. fim 07	GF100707	F: CGCTCAAGCAGTACATTCCT R: GACACGACAGCGATCATCA	$(AC)_{13}$	61	80 - 98	3,0	0,250	0,566	0,4683	0,0070
C. fim 08	GF100708	F: GAGAAGAGGGAACAGGAGGA R: GACGGAGCACCAACCATT	$(CA)_{15}$	59	52 - 54	2,0	1,000	0,520	0,375	0,0008*
C. fim 09	GF100709	F: CCCTAATCGCCTCACTTCTC R: GGGGGAGAGATAAGCAACAG	$(AC)_{17}$	62	168 - 188	11,0	1,000	0,931	0,8825	1,0000
C. fim 10	GF100710	F: GCCTCGCTGAGAGTCTTGA R: GGTTGATAGGGTCGGAGTCA	$(CACT)_{6}$	61	80 - 90	4,0	0,000	0,689	0,605	0,0002*
C. fim 11	GF100711	F: CCTCGCAACTACTGTTTGGTC R: GCGACGCATTAGAAGTAGACA	$(CA)9(CT)_{7}$	61	90 - 100	6,0	1,000	0,790	0,7215	0,2443
C. fim 13	GF100713	F: TGCCAACAAGAGAAGACTGC R: GCTCAAGCCATCAGAGTGTG	$(AC)_{14}$	61	188 - 194	4,0	0,000	0,652	0,5566	0,0002*
C. fim 14	GF100714	F: CGAATGGGAGTCTTTTGGAG R: TGACGAACGAACGAACGA	$(AC)_{11}$	58	112 - 132	7,0	0,615	0,843	0,7842	0,0334
C. fim 15	GF100715	F: AAGCGGTCAAGGTTTGGTT R: CAAAAGTTGGGGTTCGGTA	$(CA)_{14}$	56	188 - 204	8,0	1,000	0,913	0,8544	1,0000
C. fim 16	GF100716	F: TTGGTGACCTGCGAGTTTC R: TGTCCCCTTCTCTCATCTTGA	$(AC)_{21}$	60	120 - 146	6,0	0,769	0,806	0,7409	0,0920

Continua...

Tabela 12: *... Continuação*

primers	Acessos do Genbank	Seqüência dos pares de *primers*	Motivos	Ta (°C)	Amplitude alélica (bp)	A*	Ho	He	PIC	P valor (EHW)
C. fim 17	GF100717	F: TCGCCATCTTCTCTGCATAC R: TAGTGACGGAGTTGGAGACG	$(AC)_{17}$	61	130 - 142	6,0	0,846	0,843	0,7821	1,0000
C. fim 18	GF100718	F: CTCTTTTGTCCCCTTCTCTCA R: ACTTGGTGACCTGCGAGTTT	$(TG)_{16}$	61	132 - 148	7,0	0,846	0,852	0,7959	1,0000
C. fim 19	GF100719	F: AGATGAGCAAGCGATATTTCC R: CCGAGGACTGGGCTATCTAC	$(AC)_{13}$	62	90 - 138	13,0	1,000	0,929	0,8783	1,0000
C. fim 20	GF100720	F: TCGCAAGTCTCTCTTATGCTTC R: AGACGGCTCTTTAACAGGACA	$(CT)_{17}$	63	152 - 188	7,0	1,000	0,852	0,7906	1,0000
C. fim 21	GF100721	F: GCAGCAAAGAAGATGTGACCT R: GAACAGCGATTCATCACGAC	$(TG)_{10}$	61	102 - 152	9,0	0,923	0,880	0,8259	0,5230
Média						**6,650**	**0,7**	**0,776**		

A*: número de alelos; He e Ho: heterozigosidades esperada e observada, respectivamente; Ta (°C): temperatura de anelamento; PIC: conteúdo do índice de polimorfismo; P valor * significativo para EHW $p < 0,05$ depois de correção por Bonferroni.

4.2.3 Estrutura Genética

As distâncias genéticas de Rogers-W (1978) calculadas, variaram de 0,3441 a 0,7609. Com base na distância estimada observa-se que os isolados 6 e 7 são os mais similares (0,3441) e os isolados 8 e 10 são os mais divergentes (0,7609). O respectivo dendograma está apresentado na figura 13. A matriz encontra-se em anexo.

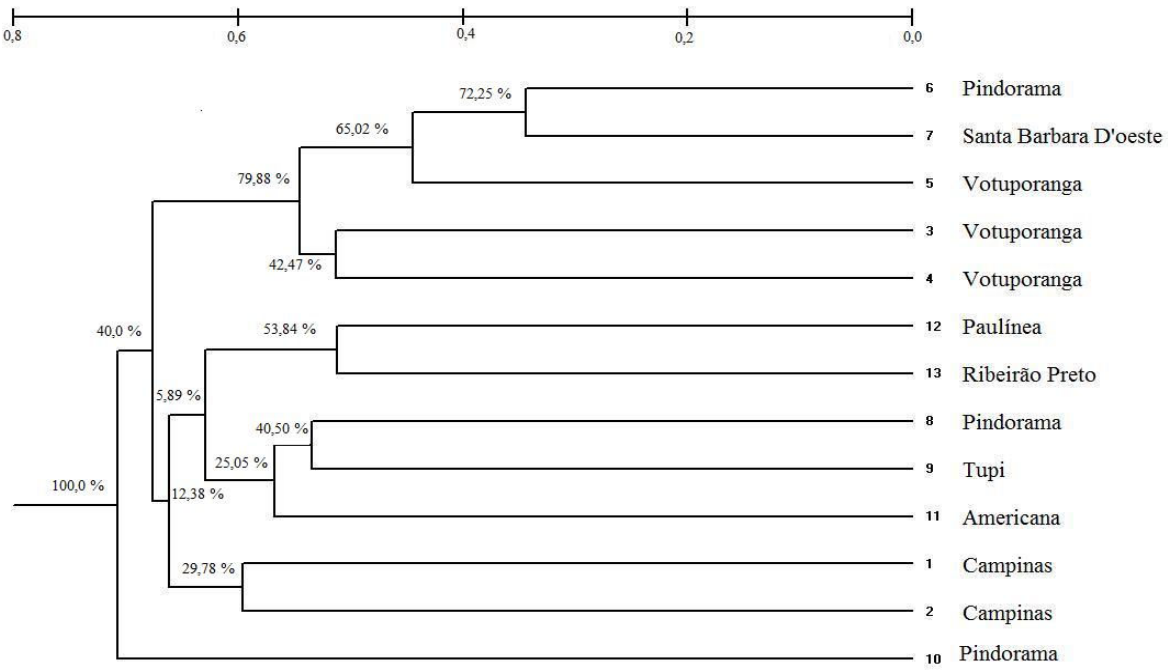

Figura 13: Padrão de divergência genética entre 13 isolados de *C. fimbriata*, definido pelo agrupamento UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Rogers-W (1978).

O programa STRUCTURE agrupou melhor os acessos em dois grupos (K=2), uma vez que com K=2 foram obtidas as maiores probabilidades. Este agrupamento é apresentado na Figura 14.

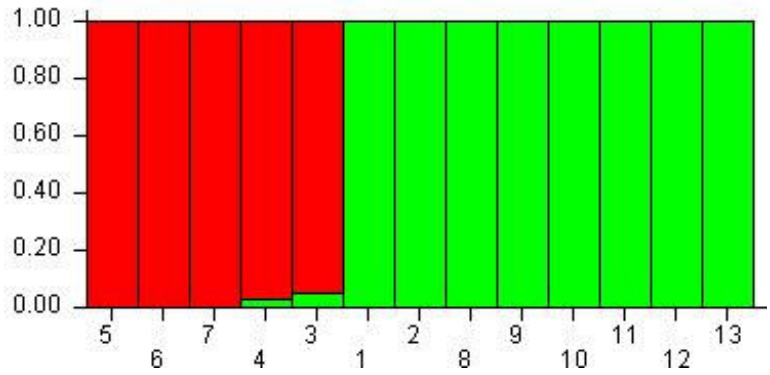

Figura 14: Arranjo das amostras em 2 grupos (K=2) realizado pelo programa STRUCTURE utilizando o marcador SSR. Na horizontal estão apresentados os acessos de *C. fimbriata* e na vertical o nível de estruturação. Amostras com a mesma cor pertencem ao mesmo grupo.

5. DISCUSSÃO

5.1. *Mangifera indica*

Como o advento dos marcadores moleculares estes possibilitaram a quantificação da similaridade genética entre genótipos e a estruturação da diversidade genética. Seu uso torna possível organizar grupos de indivíduos de acordo com padrões de similaridade ou divergência genética. Esta ferramenta se tornou muito valiosa no caso de bancos de germoplasma, sendo empregados na avaliação da divergência genética existente entre os acessos e também na construção de coleções nucleares (SOUZA, 2001).

A variabilidade genética é um instrumento de investigação muito importante para os melhoristas de plantas, principalmente para os melhoristas de espécies perenes. Os marcadores moleculares representam uma poderosa ferramenta para detectar essa variabilidade genética e fornecer informações para orientar cruzamentos entre acessos mais divergentes como no caso da mangueira, objeto deste estudo.

O germoplasma de manga disponível no Brasil atualmente é pouco caracterizado quanto a sua diversidade genética. Poucos trabalhos foram realizados utilizando marcadores moleculares.

A caracterização molecular do germoplasma de manga disponível é, também, essencial para o seu uso mais adequado em etapas subseqüentes do melhoramento. Essa caracterização molecular permitirá ao melhorista identificar acessos duplicados, simplificando a manutenção do germoplasma. Possibilita, ainda, identificar a existência de variabilidade genética nesse germoplasma, selecionar genitores e planejar novas recombinações entre os genótipos.

5.1.1. Marcadores SSRs

No Brasil, estudos envolvendo marcadores moleculares em manga são praticamente inexistentes. SCHNEL et al. (1995) estudaram a aplicação de marcadores moleculares de RAPD na identificação de acessos de manga e observaram que nenhum dos 11 primers estudados resultaram, isoladamente, em um perfil único de polimorfismo dos 25 acessos examinados. Contudo, algumas combinações de *primers* resultaram em padrões únicos de *fingerprinting* para cada acesso. ADATO et al. (1995), por sua vez, aplicaram a técnica do

DNA *fingerprinting* na identificação, análise genética e estrutura familiar de 20 acessos de manga, através de marcadores mini e microssatélites. Concluíram que essa técnica pode ser bastante útil para a identificação de acessos de manga, bem como para auxiliar no processo de melhoramento em si.

O primeiro trabalho utilizando marcadores moleculares para análise genética em mangueira foi de SOUZA et al. (2002), visando a análise genética de acessos de mangueira através de marcadores RAPD. É sempre importante ressaltar que os recentes avanços nessa área têm possibilitado a caracterização da diversidade genética de bancos de germoplasma de diversas culturas, disponibilizando informações para o pré-melhoramento das espécies.

Neste trabalho, foram utilizados 34 pares de *primers* SSRs para caracterizar 84 acessos do BAG de Votuporanga. Foram encontrados 11 locos monomórficos e 23 locos polimórficos variando de 2 a 25 alelos por loco, com uma média de 8,2 alelos por loco. A heterozigozidade observada e esperada tiveram uma média de 0,4924 e 0,605 respectivamente. Observaram-se 186 bandas polimórficas de um total de 250 bandas com uma amplitude alélica de 80 a 320pb.

CHITOSE et al. (2004) desenvolveram seis locos microssatélites para *M. indica* e caracterizaram 36 acessos da coleção de Tailândia. Desses seis locos, todos foram polimórficos e variaram de dois a seis alelos por loco. As heterozigosidades observada e esperada tiveram uma média de 0,385 e 0,503 respectivamente.

VIRUEL et al. (2004) desenvolveram 16 locos microssatélites para *M. indica* a fim de caracterizar 28 acessos de diferentes origens. Dos 16 locos, apenas 14 foram polimórficos e tiveram uma média de 5,5 alelos por loco. As heterozigosidades observadas e esperadas tiveram uma média de 0,69 e 0,65 respectivamente.

Posteriormente novos *primers* SSRs foram desenvolvidos por SCHNELL et al. (2005). Os autores utilizaram 15 locos microssatélites de *M. indica* para caracterizar 59 acessos da Flórida e quatro espécies da coleção de germoplasma dos USDA. Foram encontrados dois locos monomórficos e 13 locos polimórficos variando de dois a sete alelos por loco. As heterozigosidades observada e esperada tiveram uma média de 0,3803 e 0,4417 respectivamente.

Outro trabalho foi publicado por RISTERUCCI et al. (2005) com o desenvolvimento de 41 locos microssatélites para caracterizar 15 acessos de *M. indica,* um acesso de *M. laurina* e um acesso de *M. applanata* oriundos do banco de germoplasma de Guadalupe (FWI). Foram encontrados 13 locos monomórficos e 28 locos polimórficos variando de 3 a 13 alelos por loco. As heterozigosidades observada e esperada tiveram uma média de 0,534 e 0,588 respectivamente.

Utilizando marcadores AFLP, YAMANAKA et al. (2006), avaliaram 35 acessos de *M. indica*, *M. odorata*, *M. foetida* e *M. caesia* totalizando. Para oito pares de *primers*, foram encontradas 499 bandas polimórficas de um total de 518. Verificou-se quatro grupos de acesso, sendo eles congruentes contendo cada espécie em um grupo diferente.

MARIE-FRANCE et al. (2006) também utilizaram marcadores microssatélites em 307 acessos de *M. indica* de diferentes locais do arquipelado de Guadalupe. Foram utilizados 19 pares de *primers* e encontrado um total de 140 alelos. Três agrupamento foram verificados com uma similaridade de 73% entre os acessos.

SANTOS et al. (2008) também utilizaram marcadores AFLP em 105 acessos de *M. indica* do banco de germoplasma da Embrapa. Para os 13 *primers* utilizados, foram obtidas 157 bandas polimórficas e 54 bandas monomórficas. Cinco grupos foram formados com uma similaridade superior a 51%.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os demais relatados, observa-se que a maior amplitude alélica e uma das maiores heterozigosidades, tanto observada como esperada. Confirmando assim, o alto grau de polimorfismo dos *primers* utilizados e uma alta variabilidade genética de BAG do Instituto Agronômico.

A maioria dos locos analisados neste estudo não se encontra em EHW, como já era esperado, pois se trata de uma coleção de germoplasma que apesar da condição de alogamia da mangueira, estes acessos vieram de várias localidades e sem origem comum e não se tem conhecimento sobre cruzamentos naturais no BAG.

Comparando a distância genética obtida com marcadores SSR a amplitude de variação foi de 0,5630. A distância de genética variou de 0,2887 a 0,8660, sendo os indivíduos 06 e 09; 16 e 17 os mais similares e os indivíduos 73 e 75 e também os indivíduos 83 e 23 os mais divergentes (matriz em anexo). O teste de atribuição entre os indivíduos atribuiu os 84 indivíduos genotipados com 23 locos a três grupos concordantes com o resultado gerado com o marcador dominante ISSRs, apesar dos grupos formados não possuírem exatamente os mesmos indivíduos.

5.1.2. Marcadores ISSRs

Os marcadores moleculares ISSRs tem sido muito utilizados na caracterização de germoplasma (EIADTHONG et al., 1999) inclusive na cultura da magueira (PANDIT et al., 2007).

Neste trabalho foram utilizados 65 acessos de manga do BAG de Votuporanga utilizando 12 *primers* polimórficos de ISSRs. No Brasil, o uso deste marcador, também é inédito.

A presença de primers com bandas monomórficas não é informativa para as análises feitas. Porém os locos utilizados foram os que apresentaram polimorfismo entre os genótipos estudados e as análises genéticas nos forneceu um total de 162 bandas onde 110 foram polimórficas (67,9%). Dos 15 primers utilizados somente três deles apresentaram bandas monomórficas entre os acessos de mangueira utilizados no estudo. Na caracterização da estrutura genética dos acessos analisados pelo dendrograma, verificar-se a formação de três grupos coerentes com o teste de atribuição realizado com o auxílio do programa Structure.

As análises de *bootstrap*, realizadas pelo programa BooD (COELHO, 2001), resultou no dendrograma robusto, porém com alguns nós com pouca consistência. Foram considerados nós consistentes *bootstraps* > 50%. Pode-se verificar a congruência entre os grupos gerados pelo teste de atribuição do Structure com o dendrograma feito a partir das dissimilaridades genéticas. Tanto as análises geradas pelo programa Structure como o dendrograma organizaram as amostras em três grupos. Porém estes grupos não são coincidentes com os dados obtidos a partir dos marcadores SSRs. Uma análise mais detalhada deve ser feita para verificar o motivo de diferentes marcadores amostrarem de forma diferente o BAG. Porém considera-se que os grupos gerados com ambos marcadores são importantes para o manejo e organização do germoplasma.

A similaridade genética variou de 0,21 a 0,88, portanto uma amplitude de 0,67 de similaridade genética, sendo os acessos 02 e 03 os mais similares com 0,88 índice de similaridade de Jaccard e sendo o 33 e 35 os acessos mais divergentes dos demais com somente 0,21 de similaridade genética. A análise feita pelo critério UPGMA revelou a formação de três grupos, como ditos anteriormente coerentes com o teste de atribuição. Porém nem todos os acessos dos grupos formados são congruentes com a análise feita com marcadores SSRs.

EIADTHONG et al. (1999) utilizaram 40 *primers* ISSRs para caracterizar 13 acessos de manga de diferentes origens. Dos *primers* utilizados, somente sete geraram polimorfismo. O número de bandas geradas variou de 8 a 21 bandas polimórficas. A similaridade foi de 56% o qual gerou a divisão em três grupos de acordo com os locais de coleta dos materiais.

Um novo trabalho foi publicado por PANDIT et al. (2007) utilizando 33 *primers* polimórficos para 70 acessos de manga de toda Índia. Foi obtido um total de 420 bandas,

sendo 408 bandas polimórficas. O agrupamento foi de dois grupos, dividindo distintamente os acessos do Norte e do Sul da Índia.

Comparando os resultados obtidos nesta pesquisa com os demais, observa-se o maior número de bandas polimórficas obtidas em relação ao número de *primers* utilizados. Confirmando mais uma vez, o alto grau de polimorfismo de nossos *primers* e uma alta variabilidade genética de nosso BAG.

5.2. *Ceratocystis fimbriata*

Desde a descoberta de locos microssatélites, a obtenção de *primers* amplificadores tem sido realizada pela simples inspeção de bibliotecas genômicas.

Contudo, bibliotecas não enriquecidas apresentam somente 0,5 a 10% de regiões SSR, tornando necessária a obtenção de um grande numero de clones para localização e desenvolvimento de *primers* (BILLOTE et al., 1999).

No presente estudo, o desenvolvimento de locos microssatélites específicos para *Ceratocystis fimbriata* foi realizado através do enriquecimento da biblioteca genômica para locos SSR. O processo de enriquecimento por meio de hibridização seletiva com sondas biotinizadas e posterior separação magnética foram eficazes em isolar regiões microssatélites para a caracterização molecular do germoplasma. Embora existam outros métodos de enriquecimento com eficiência similar, a técnica empregada aqui tem sido a mais utilizada atualmente (ZANE et al., 2002; MAGUIRE, 2001).

Dos 196 insertos seqüenciados, 174 (88,77%) apresentaram pelo menos uma região microssatélite, sendo esta porcentagem superior a outros estudos utilizando outras técnicas (BON et al., 2005; BYRNE et al., 2008). Contudo, vale ressaltar que os motivos mais freqüentes aqui encontrados foram de pentanucleotideos com somente duas repetições, devido aos critérios de busca empregados. Estes motivos não foram utilizados para síntese de *primers*, uma vez que regiões com poucas repetições dificultam a identificação de polimorfismo entre indivíduos. Excluindo-se estes motivos da biblioteca o número de regiões microsatelites presentes nos clones seqüenciados diminuiria drasticamente, embora não o suficiente para justificar o uso de outras técnicas que não empregam enriquecimento. Esta relação, onde os parâmetros de busca por *primers* influenciam no numero de locos SSR encontrado, indica que a eficiência dos diferentes métodos pode ser comparada quando os parâmetros forem iguais (MOTTURA et al., 2004).

Os motivos mais freqüentes encontrados em *Ceratocystis fimbriata* foram de dinucleotideos AC e TG. A grande quantidade de motivos dinucleotideos encontrada se deve ao fato de que, das sondas empregadas no enriquecimento da biblioteca, duas eram de repetições de motivos dinucleotideos. Por sua vez, a sonda de motivos trinucelotideos utilizada não obteve sucesso no resgate de seqüências com tais repetições, provavelmente devido à falta de homologia com o genoma da espécie ou a problemas relacionados à degradação da sonda ou concentração não ideal de oligonucleotideos.

Desconsiderando-se os motivos pentanucleotideos, 30% das regiões SSR encontradas puderam ser utilizadas, gerando 22 pares de *primers*. Deste, 21 tiveram motivos dinucleotídeos e 1 tetranucleotídeo (Cfim10). Estes podem ser classificados em 20 *primers* perfeitos e 2 *primers* compostos (Cfim11 e Cfim12). Destes, somente 20 puderam ser utilizados para genotipagem dos acessos, pois os demais não geraram polimorfismo.

Comparando as heterozigosidades com o teste exato de Fisher, verificou-se que a maioria dos isolados não se encontra em EHW, mas como se trata de uma coleção, isto já era esperado.

Os 20 locos selecionados para genotipagem apresentaram bom polimorfismo, com uma media de 6,65 alelos por loco, sendo a amplitude alélica variando de 48 a 204 pares de base. Em uma distância genética de 70%, houve agrupamentos dos isolados em dois grandes grupos, sendo coerente com a geografia. Este agrupamento corresponde com o agrupamento gerado pelo programa Structure.

Outro conjunto de marcadores microssatélite foi desenvolvido para *C. fimbriata* (STEIMEL et al., 2004). Estes autores desenvolveram 16 *primers* para C. fimbriata onde todos foram polimórficos para os quatro isolados utilizados. O número de alelos por loco varou de dois a 20, mas foi encontrado um baixo grau de polimorfismo em seus acessos.

Comparando os resultados deste trabalho, observa-se o alto polimorfismo dos *primers* e a alta variabilidade genética nos isolados associados à Manga, comprovando que este conjunto de iniciadores é altamente informativo.

Este novo conjunto de marcadores representa uma poderosa ferramenta para o estudo e o manejo do patógeno *C. fimbriata*, no Brasil e em todo o mundo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que:

Mangifera indica

a) Os marcadores SSRs e ISSRs foram eficientes em detectar a variação genética no germoplasma de manga do BAG de Votuporanga;

b) Os acessos do germoplasma do BAG foram distribuídos em três grupos geneticamente distintos com base nos marcadores SSRs e ISSRs;

Ceratocystis fimbriata

a) O método de enriquecimento utilizado foi eficiente em isolar locos microssatélites específicos para *Ceratocystis fimbriata*;

b) Os primers específicos foram desenhados com êxito para a espécie;

c) A coleção analisada apresenta alta variabilidade genética;

d) Os marcadores moleculares diferenciaram os isolados conforme a geografia;

e) Os dados moleculares obtidos forneceram informações sobre a diversidade genética dos isolados, permitindo o manejo da coleção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATO, A.; SHARON, D.; VAVI, U. Application Fd DNA Fingerprints For Identification and Genetic Analyses of Mango (*Mangifera Indica*) Genotypes. Journal of the American Society for Horticultural Science, V.120, N.2, P.259-264, 1995.

AL-SUBHI, A.M.; AL-ADAWI, A.O.; VAN WYK, M.; DEADMAN, M.L.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis omanensis*, a new species from diseased mango tree in Oman. Micological Research, v., p.237-245, 2006.

ALFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

ALMEIDA, C.O.; CARDOSO, C. E. L.; SANTANA, M. A. Comercialização. In: Pereira MEC, Fonseca N, Souza FVD (Eds.) Manga: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica. pp. 177-184, 2005.

ALVES, R. M. Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Shum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos. 2002, 159p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

BAKER, C.J. & HARRINGTON, T.C. *Ceratocystis fimbriata*. Surrey, England, CABI Publishing, 2004.

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

BLEINROTH, E.W. Determinação do ponto de colheita das frutas. In: Instituto de tecnologia de alimentos. Tecnologia de pós-colheita de frutas tropicais. Campinas: ITAL, 1988. cap.l, p.1-17.

BON, M.C.; HURARD, C.; GASKIN, J.; RISTERUCCI, M. Polymorphic microsatellite markers in polyploidy Lepidium draba L. ssp. Draba (Brassicaceae) and cross-species amplification in closely related taxa. Molecular Ecology Notes, n.5, p.68-70, 2005.

BORÉM, A. & CAIXETA, E. T. Marcadores moleculares. Viçosa – M.G., 374p., 2006.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter, Georgia, v.19, p.209-215, 2001.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. Manga. Brasília, 1999, 4p. (FrutiSéries, 2 – Minas Gerais).

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. Gene, v.234 (2), p.177-186, 1999.

BRUNINI, O.; ALFONSI, R. R. Aptidão ecológica para a Mangueira. In: Simpósio brasileiro sobre a cultura da mangueira, 1., 1980, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: UNESP, 1980. p. 23 – 33.

BYRNE, M.; HANKINSON, M.; SAMPSON, J.F.; STANKOWSKI, S. Microsatellite markers isolated from a polyploid saltbush, Atrilex nummularia Lindl. (Chenopodiaceae). Molecular Ecology Resources, v.8, n. 6, p. 1426-1428, 2008.

CAMARGO, A.P.; PEDRO, M.J.; ALFONSI, R.R.; ORTOLANI, A.A.; PINTO, H.S. Zoneamento agrícola do estado de São Paulo, aptidão climática. São Paulo: Secretaria do Estado de São Paulo, n.2, 1977. 131p.

CAMPBELL, R. J. A guide to mangos in Flórida, Miami: Ed Fairchild Tropical Gardens, 1994. p.188 –191.

CASTELO, A. T.; MARTINS, W.; GAO, G. R. TROLL – Tandem Repeat Occurence Locator. Bioinformatics, v.18 (4), p.634-636, 2002.

CASTRO, P.R.C. & KLUGE, R. A. (Coord.). Ecofisiologia de fruteiras tropicais: abacaxizeiro, maracujazeiro, mangueira, bananeira e cacaueiro. São Paulo: Nobel, 1998.

CHAMBERS, J. K. & MACAVOY, E. S. Microssatellete: Consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology, v.126, p.455-476, 2000.

CHITOSE, H.; KIYOMI, N.; WICHAN, E.; KEIZO, Y. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango (*Mangifera indica*). Molecular Ecology Notes (2005), p. 152–154.

COELHO, A.S.G. BOOD - Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 2001.

CONDIT, R. & HUBBELL, S. P. Abundance and DNA frequence of 2-base repeat regions in tropical tree genomes. Genome, v.34, p.66-71, 1991.

COSTA, D.C.S.; MACHADO, M.A.; CAMPOS, A.N.; VICCINI, L.F.; EIXOTO,P.H.P.; SALIMENA, F.R.G. Diversidade genética em *Lippia* spp. (Verbenaceae) da cadeia do espinhaço-MG por meio de marcadores moleculares RAPD. In: Congresso Nacional de Genética, 48., 2002, Águas de Lindóia. Anais. CD-Rom.

COUTO, F.A.A.; SIQUEIRA, D.L.; RABELO, J.E.S. Situação e perspectiva da mangicultura no Estado de Minas Gerais. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I.V.B.; MARTINS FILHO, J.; MORAES, O.M. (Ed.) Manga: tecnologia de produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1996. p. 322-328.

DONADIO, L. C.; FERREIRA, F. R. Mangueira. In: Congresso de melhoramento de fruteiras tropicais. UFV, Viçosa, Minas Gerais, 2002, p. 351-372.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. Focus, v.12, p.13-15, 1990.

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

EIADTHONG, W.; YONEMORI, K.; SUGIURA, A.; UTSUNOMIYA, N.; SUBHADRABANDHU, S. Identification of mango cultivars of Thailand and evoluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat – (SSR-) anchored primers. Scientia Horticulturae 82 (1999) p. 57-66.

FAO, Disponível site FAO http://apps.fao.org/lim500/nlp-weap.pl. Consultado em 20 de setembro de 1998 às 16 horas.

FAO, Disponível site FAO http://apps.fao.org/lim500/nlp-weap.pl. Consultado em 05 de outubro de 2002 às 16 horas..

FERNANDES, R. C. Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequizeiro (*Caryocar Brasiliense Camb*.) no Norte de Minas Gerais, 2008, 65p. (Dissertação Mestrado), UFLA, Lavras.

FERREIRA, F. A. Patologia florestal, principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, MG: SIF, UFV, 1989. 570 p.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. Introducción al Uso de Marcadores moleculares en el Análisis Genético. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN, 220p., 1998.

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. (Visual diagnosis and control of abiotic and biotic eucalyptus diseases in Brasil). Mogi-Guaçu: International Paper, 2002. 104 p.

FIELD, D. & WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. Proceedings: Biological Sciences, v.263, n.1367, p.209-215, 1996.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with ZDNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukayotic genomes. Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, v.79, p. 6465-6469, 1982.

HAMRICK, J. L. Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations. In: Soltis, D. E.; Soltis, P. S. (ed.). London: Chapman and Hall, p.335-348, 1989.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, v. 72, p.761-769. 1986.

HUANG, X. & MADAN, A. Cap3: a DNA sequence assembly program. Genome Research, v.9 (9), p.868-877, 1999.

IBGE, Disponivel site IBGE http://www.sidra.ibge.gov.br/egi.bin/prtabl. Consultado em 20 de setembro de 1998 às 16:30 horas

KWOK, P. Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. Annual Review of Genomics and Human Genetics, v.2, p.235-258, 2001.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. (Software) 2000. Version 1.0(d12). Disponível em: <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>. Acesso em: 04 fev. 2010.

LIU B.;JONATHAN F.W. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes, v.1, n.3, p. 205–208. 2001.

MANICA, I. Fruticultura tropical: manga. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 135p.

MAGUIRE, T.L. Producing and exploiting enriched microsatellite libraries. In: HENRY, R.J. (ed.) Plant Genotyping – The DNA fingerprinting of plants. CABI publishing, p.193-210, 2001.

MARIE-FRANCE, D.; BUNEL, J.; SITBON, C.; RISTERUCCI, ANGE-MARIE.; CALABRE, C.; BELLEC, F. L. Genetic diversity of Caribbean mangoes (*Mangifera indica* L.) using microsatellite markers. In: International Mango Symposiun, February 5-10, 2006, Sun City, South Africa.

MARKERT, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: issue, ontogenetic and species specific patterns. Proc Natl Acad Sci USA, v45, p.753-763, 1959.

MILLER, M.P. (1997) TFPGA – tools for population genetic analyses v.1.3., Northern Arizona University.

MISSIAGLIA, A. A. Mapeamento genético de QTL para qualidade da madeira e florescimento precoce e estudos de expressão gênica alelo específica em *Eucaliptus* spp. Piracicaba-SP. 236 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 2005.

MISSIAGLIA, A. & GRATTAPAGLIA, D. Plant microssatellite genotyping with 4- color fluorescent detection using multiple-tailed *primers*. Genetics and Molecular Research, v.5 (1), p.72-78, 2006.

MOLLER, W.J. & DE VAY, J. Carrot as a species-selective isolation medium for *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology 58:123-124. 1968.

MORGANTE, M. & OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microssatellites asmarkers in plant genetics. The Plant J., v.3, p.175-182, 1993.

MOTTURA, M.C.; GAILING, O.; VERGA, A.; FINKELDEY, R. Efficiency of microsatellite enrichment in Prosopis chilensis using magnetic capture. Plant Molecular Biology Reporter, n.22, p. 251-258, 2004.

MUKHERJEE, S.K. The mango - its botany, cultivation, uses and future improvement especially as observed in India. Economic Botany, 7 (2):130-162. 1953.

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

MULLIS, K. & FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. V.55, p.335-350. 1987.

NEI, M. Estimation of average heterozigozity and genetic distance form a small number of individuals. Genetics, v.89, p. 583-590, 1978.

NOBELPRIZE – Nobelprize.org, http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates /1993/index.html, (15 julho 2006).

OLIVEIRA, S. M. A.; TERRAO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais, Brasília DF. Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

PANDIT, S. S.; MITRA, S.; GIRI, A. P.; PUJARI, K. H.; PATIL, B. P.; JAMBHALE, N. D.; GUPTA, V. S. Genetic diversity analysis of mango cultivars using inter simple sequence repeat markers. Current Science, v. 93, n. 8, 2007.

PARAMN, I. & MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. Theoretical and Applied Genetics, v. 85, p.985-993. 1993.

PINTO, A.C.Q.; ROSSETTO, C.J.; FALEIRO, F.G. Melhoramento genético da manga: métodos, resultados, limitações e estratégias. In: Simpósio de manga do Vale do São Francisco, 1, 2005, Juazeiro. Embrapa Semi-Árido, 2005. (Documentos 189). CD-Rom.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

ROLF, F.J. NTSYS-Pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publisher, 1989. 210p.

ROSSETTO, C.J. & RIBEIRO, I.J.A. Seca-da-mangueira XII. Recomendações de controle. Revista de Agricultura, v. 65, n.2, p.173-180. 1990.

ROSSETTO, C.J.; RIBEIRO, I.J.A.; IGUE, T.; GALLO, P.B. Seca-da-mangueira XV. Resistência varietal a dois isolados de *Ceratocystis fimbriata*. Bragantia, v.55, n.1, p.117-121, 1996.

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

SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P. C. (Ed). Handbook of environmental physiology of fruit crops: sub– tropical and tropical crops. Flórida: CRC Press, 1994. v.2.

SCHLÖTTERER, C., TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research, v.20, p. 211-215, 1992.

SCHLÖTTERER, C.; RITTER, R.; HARR, B.; BREM, G. High mutation rate of a long microssatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. Molecular and Biology Evolution. v.15, n.10, p.1269-1274, 1998.

SCHNELL, R.J.; RONNING, C.M; KNIGHT, R.J. Identification of Cultivars and Validation of Genetic Relationships in *Mangifera indica* L. Using RAPD Markers. Theoretical And Applied Genetics, V.90, p.269-274, 1995.

SCHNELL, R. J.;OLANO, C. T.; QUINTANILLA, W. E.; MEEROW, A. W. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa. Molecular Ecology Notes (2005), p. 625–627.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; SERA, T.; CARVALHO, V. P.; COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. Genetics and Molecular Biology, 26, 3, 329-336 (2003)

SIMÃO, S. Situação da cultura da mangueira no Brasil. In: Simposio brasileiro sobre a cultura da mangueira, 1980, Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: UNESP, 1980. p.3-ll

SINGH, R.N., MAJUMDER, P.K. & SHARMA, D.K. Sex-expression in mango(*Mangifera indica* L.) with reference to prevailing temperature. Proceedings of the Amer. Soc. Hort. Sci. 89:228-229, 1967.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, v.130, p.457-462, 1995.

SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P. S. Isozymes in plant biology. Dioscorides. Portland, OR. 1989.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. (ed.). Recursos genéticos e melhoramento. Rondonópolis: Fundação MT, p.939-965, 2001.

SOUZA, J. da S.; ALMEIDA, C.O. de; ARAÚJO, J.L.P.; CARDOSO, C.E.L. Aspectos socioeconômicos. In: GENÚ, P.J.de C.; PINTO, A.C.de Q. (Ed.) A cultura da mangueira. Brasília: Embrapa, 2002. p. 20-29.

SUBRAMANYAM, H.; KRISHNAMURTHY, S.; PARPIA, H.A.B. Physiology and Biochemistry of Mango Fruit. In: CHICHESTER, C.O.; MRAK, E.M.; STEWART, G.F. (Ed.) Advances in food research. New York: Academic Press, 1975. v. 21, p. 223-305.

STEIMEL, J.; ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Development and characterization of microsatellite markers for the fungus *Ceratocystis fimbriata*. Molecular Ecology Notes, v. 4, p. 215-218, 2004

STRAND, M.; PROLLA, T. A.; LISKAY, R. M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature, v.365, p.274-276, 1993.

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A. Y. Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea* ssp Leguminosaea) utilizando microssatélites. 2001. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03pdf/03-007.pdf.>. Acesso em 13 fev. 2005.

TAUTZ, D. & RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive componets of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, v.12, n.10, p. 4127-4138, 1984.

THOMPSON, J. D.; PLEWNIAK, F.; POCH, O. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. Nucleic Acids Res., v.27, p.2682-2690, 1999.

TÓTH,G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. Genome Research, v. 10, n.7, p. 967-981, 2000.

VAN WYK, M.; AL-ADAWI, A.O.; WINGFIELD, B.D.; AL-SUBHI, A.M.; DEADMAN, M.L.; WINGFIELD, M.J. DNA based characterization of *Ceratocystis fimbriata* isolates associated with mango decline in Oman. Australasian Plant Pathology, v.34, p. 587-590, 2005.

VANTOAL, T. T.; PENG, J.; MARTINS, S. S. Using AFLP markers to determinate the contribution of parental genomes during recurrent selection. Soybean Genetics Newsletter, v.23, p.214-216, 1996.

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

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

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, v.18, p.6531-6535. 1990.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, nº 0534858 A1. 1993.

ZANE, L.; BARGRLLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microssatellites isolation: a review. Molecular Ecology, v.11, p.1-6, 2002.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, San Diego, v.20, p.176-183, 1994.

YAMANAKA, N.; HASRAN, M.; XU, D. H.; TSUNEMATSU, H.; IDRIS, S.; BAN, T. Genetic relationship and diversity of four *Mangifera* species revealed though AFLP analysis. Genetic Resources and Crop Evolutio (2006) 53: p. 949-954.

ANEXOS

Anexo 01: Matriz de distância genética de marcadores SSR para *C. fimbriata.*

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	*****												
2	0.5960	*****											
3	0.6860	0.6070	*****										
4	0.6417	0.7071	0.5130	*****									
5	0.7174	0.6689	0.5130	0.5257	*****								
6	0.6301	0.6689	0.5130	0.5257	0.4443	*****							
7	0.6966	0.7255	0.5960	0.5960	0.4443	0.3441	*****						
8	0.6070	0.5669	0.6489	0.6977	0.6689	0.6387	0.7071	*****					
9	0.6283	0.6901	0.7071	0.6977	0.7071	0.6882	0.7071	0.5345	*****				
10	0.7376	0.7434	0.7265	0.7071	0.7360	0.7169	0.6872	0.7609	0.7255	*****			
11	0.6642	0.7255	0.7265	0.7169	0.7169	0.6770	0.6562	0.5960	0.5380	0.5960	*****		
12	0.6589	0.7155	0.6589	0.6283	0.6387	0.5960	0.6177	0.7071	0.6268	0.6977	0.6283	*****	
13	0.6283	0.7237	0.6786	0.6689	0.6977	0.6882	0.6882	0.6726	0.6268	0.6489	0.5130	0.5118	*****

Anexos 02: Matriz de distância genética de marcador SSR para M. indica.

Indiv.	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	88	89	90
4	0.0000
5	0.3371	0.0000
6	0.5701	0.5000	0.0000
7	0.6614	0.7071	0.6455	0.0000
8	0.5916	0.5916	0.5000	0.3873	0.0000
9	0.5000	0.6455	0.0000	0.4082	0.0000	0.0000
10	0.5916	0.5916	0.5423	0.6124	0.5145	0.6124	0.0000
11	0.5270	0.5244	0.4677	0.5000	0.4851	0.4330	0.5000	0.0000
12	0.6216	0.5951	0.5501	0.5774	0.5849	0.4330	0.5849	0.4292	0.0000
14	0.5839	0.5951	0.6070	0.6124	0.5620	0.3536	0.5849	0.4730	0.5839	0.0000
15	0.6708	0.6571	0.6055	0.7360	0.6417	0.7071	0.5774	0.5449	0.5652	0.4859	0.0000
16	0.6268	0.5345	0.4629	0.5000	0.5323	0.0000	0.5547	0.4804	0.5323	0.6455	0.6268	0.0000
17	0.8660	0.8660	0.5774	0.8660	0.2887	0.3536	0.6708	0.5774	0.7071	0.5000	0.6124	0.0000	0.0000
18	0.6009	0.6009	0.5000	0.6455	0.5423	0.0000	0.4867	0.4677	0.5130	0.5501	0.5774	0.5510	0.2500	0.0000
19	0.6236	0.6325	0.6183	0.4564	0.5652	0.4330	0.6562	0.5270	0.5477	0.5244	0.6301	0.5669	0.4472	0.5401	0.0000
20	0.6236	0.6519	0.4282	0.5477	0.5557	0.4330	0.5995	0.5557	0.5528	0.6236	0.6495	0.5547	0.7071	0.3750	0.5270	0.0000
21	0.6325	0.6571	0.5863	0.5477	0.5154	0.2887	0.6124	0.5154	0.5960	0.5620	0.6455	0.6455	0.4330	0.4249	0.5528	0.4697	0.0000
22	0.7319	0.7500	0.7217	0.5477	0.6409	0.5000	0.6355	0.6409	0.6583	0.6455	0.6944	0.7071	0.8165	0.5883	0.6455	0.5774	0.3780	0.0000
23	0.7500	0.6708	0.7071	0.5000	0.6708	0.4082	0.6770	0.5916	0.5976	0.6814	0.6325	0.6455	0.7638	0.5916	0.6770	0.5000	0.5976	0.4330	0.0000
24	0.7454	0.7071	0.6301	0.7071	0.5863	0.0000	0.6455	0.5774	0.6124	0.6455	0.6124	0.5000	0.6124	0.5501	0.6063	0.5627	0.5528	0.5547	0.6325	0.0000
25	0.6708	0.6571	0.6183	0.4330	0.5557	0.3536	0.5863	0.5528	0.5501	0.5501	0.5590	0.5883	0.5000	0.5303	0.5423	0.5816	0.5995	0.6124	0.5000	0.5774	0.0000
26	0.5270	0.5916	0.6183	0.5916	0.5557	0.2500	0.6301	0.5557	0.5620	0.5501	0.5863	0.6045	0.7746	0.5145	0.6708	0.5145	0.5688	0.5825	0.6124	0.6374	0.5000	0.0000
27	0.5916	0.6216	0.6562	0.5000	0.5816	0.3536	0.6562	0.5816	0.6225	0.5809	0.6250	0.6794	0.8062	0.5401	0.6786	0.5423	0.5401	0.5916	0.6455	0.6301	0.5000	0.3035	0.0000
28	0.6030	0.5401	0.5735	0.5774	0.6070	0.4330	0.5809	0.5257	0.5539	0.5741	0.5774	0.5916	0.6708	0.5000	0.6455	0.5000	0.6021	0.6847	0.5976	0.6177	0.5257	0.4873	0.4756	0.0000
29	0.6742	0.6124	0.6070	0.7071	0.5960	0.6124	0.6519	0.5960	0.6484	0.5839	0.6236	0.6191	0.5477	0.6021	0.6547	0.6177	0.6708	0.7500	0.7559	0.6283	0.6177	0.5590	0.5976	0.4299	0.0000
30	0.7071	0.7230	0.6860	0.5401	0.6183	0.4082	0.6872	0.5816	0.6423	0.5809	0.6301	0.6682	0.5590	0.6236	0.5849	0.6183	0.6124	0.5728	0.7746	0.6966	0.5423	0.5401	0.6021	0.5876	0.5233	0.0000
31	0.6742	0.6770	0.6872	0.6325	0.5688	0.2500	0.6872	0.5816	0.6519	0.5916	0.6374	0.6355	0.6325	0.6346	0.5735	0.6183	0.6124	0.7071	0.7319	0.7376	0.5401	0.5130	0.6021	0.6814	0.6547	0.5849	0.0000
32	0.6742	0.6770	0.5893	0.5774	0.6070	0.3536	0.6283	0.5257	0.5563	0.6172	0.5774	0.5774	0.6124	0.5620	0.6423	0.5849	0.6387	0.6960	0.5401	0.6124	0.5000	0.5735	0.6124	0.5935	0.6742	0.5809	0.6021	0.0000
33	0.6009	0.5916	0.5728	0.6708	0.5774	0.4082	0.6009	0.5286	0.5380	0.5620	0.5557	0.6547	0.6614	0.5401	0.6177	0.5652	0.5774	0.6325	0.5000	0.6063	0.4022	0.4564	0.4410	0.5477	0.6519	0.5893	0.5528	0.4873	0.0000
34	0.6124	0.5976	0.5510	0.5000	0.5976	0.4330	0.5627	0.5323	0.5688	0.5688	0.5547	0.5590	0.5477	0.5477	0.6301	0.5345	0.5164	0.6202	0.5477	0.5825	0.5669	0.6124	0.5816	0.3909	0.4714	0.5286	0.6731	0.6417	0.5916	0.0000
35	0.5916	0.5244	0.5893	0.6614	0.6009	0.5000	0.5809	0.5145	0.5809	0.5000	0.5728	0.6547	0.5477	0.5000	0.5501	0.5286	0.4867	0.5825	0.6455	0.5960	0.5000	0.5270	0.5000	0.4880	0.5563	0.5735	0.6070	0.6423	0.4443	0.5154	0.0000
36	0.5701	0.5701	0.5528	0.7071	0.5423	0.4082	0.5652	0.4507	0.5735	0.5257	0.5774	0.5718	0.5000	0.4859	0.5893	0.4841	0.5286	0.6504	0.5916	0.6301	0.5145	0.5401	0.5735	0.5590	0.5701	0.5652	0.6177	0.5960	0.5145	0.5164	0.4867	0.0000
37	0.6216	0.6292	0.5735	0.5000	0.5380	0.2500	0.6021	0.4730	0.5330	0.5935	0.6455	0.5323	0.5477	0.5362	0.5563	0.5501	0.5477	0.6250	0.5976	0.6283	0.5501	0.5701	0.5455	0.5805	0.6342	0.5774	0.5976	0.5330	0.5123	0.4859	0.5345	0.4183	0.0000
38	0.7246	0.7230	0.6562	0.6124	0.6124	0.3536	0.6562	0.6009	0.6637	0.5669	0.6301	0.6682	0.5000	0.6346	0.5960	0.6642	0.6562	0.6583	0.7071	0.6860	0.5528	0.6124	0.6423	0.6268	0.6455	0.5590	0.6283	0.6124	0.5528	0.6063	0.6070	0.5774	0.5669	0.0000
39	0.6571	0.6396	0.6417	0.5916	0.5774	0.4082	0.5652	0.5286	0.5735	0.5380	0.6374	0.6944	0.5590	0.5774	0.5893	0.6301	0.5145	0.5345	0.5916	0.6183	0.5816	0.6063	0.6124	0.5916	0.6708	0.6236	0.6667	0.6325	0.5652	0.5774	0.5501	0.4564	0.5244	0.4859	0.0000
40	0.6892	0.6571	0.6236	0.6770	0.6387	0.5000	0.6882	0.5270	0.6455	0.6455	0.6667	0.6831	0.4472	0.5735	0.6455	0.6489	0.6387	0.7500	0.6268	0.6236	0.5893	0.6225	0.6614	0.6908	0.6826	0.6801	0.6124	0.6075	0.6519	0.7071	0.6225	0.4588	0.5741	0.6614	0.6177	0.0000
41	0.5590	0.6009	0.5590	0.5000	0.6063	0.3536	0.5941	0.5000	0.5735	0.5735	0.5449	0.5976	0.3873	0.5000	0.6070	0.5941	0.5286	0.6325	0.5976	0.5449	0.5154	0.5893	0.6124	0.6124	0.6708	0.5774	0.6009	0.5257	0.6009	0.6183	0.5774	0.5688	0.5590	0.5652	0.5816	0.4183	0.0000
43	0.7230	0.6908	0.6455	0.6325	0.6070	0.4082	0.5849	0.5270	0.6225	0.6021	0.6530	0.6455	0.4330	0.5257	0.6177	0.6009	0.5774	0.6191	0.5477	0.5893	0.5401	0.5774	0.6070	0.5976	0.6637	0.6283	0.6177	0.5976	0.5960	0.6250	0.6325	0.5735	0.5976	0.5501	0.5123	0.5123	0.4249	0.0000
44	0.6030	0.5774	0.5960	0.6455	0.6283	0.5000	0.6124	0.5620	0.5935	0.5641	0.5893	0.6055	0.7071	0.5477	0.6547	0.5849	0.6423	0.7181	0.6268	0.6283	0.5620	0.5590	0.5563	0.3901	0.5000	0.6268	0.6637	0.6216	0.6124	0.4859	0.5976	0.5590	0.5989	0.6547	0.5916	0.6908	0.6423	0.6172	0.0000
45	0.6571	0.6292	0.6177	0.6124	0.5960	0.4330	0.6021	0.5620	0.5641	0.5935	0.5652	0.6055	0.5916	0.5809	0.6075	0.5849	0.5916	0.6250	0.6814	0.5960	0.4867	0.4873	0.5233	0.5517	0.5517	0.5669	0.5774	0.5935	0.5362	0.5528	0.5345	0.5123	0.5417	0.5876	0.5809	0.6396	0.5362	0.5563	0.5805	0.0000
46	0.6396	0.6292	0.6070	0.5774	0.5257	0.4330	0.6614	0.5735	0.5839	0.5935	0.6236	0.5477	0.7071	0.6021	0.5876	0.5501	0.6124	0.6250	0.5976	0.5960	0.5000	0.5590	0.5976	0.5614	0.6168	0.5976	0.6268	0.6030	0.5590	0.5774	0.5876	0.6021	0.5989	0.5563	0.5701	0.6396	0.5701	0.5455	0.5710	0.4778	0.0000
47	0.6030	0.5590	0.5960	0.6770	0.6177	0.6124	0.6021	0.5620	0.6030	0.6216	0.6455	0.6325	0.6708	0.5701	0.6637	0.6177	0.6325	0.7181	0.7071	0.6589	0.5960	0.6225	0.6268	0.4663	0.5213	0.6455	0.7071	0.6307	0.6124	0.4859	0.5455	0.5590	0.5805	0.6901	0.5701	0.6742	0.6614	0.6268	0.4423	0.5614	0.5614	0.0000
48	0.6455	0.6325	0.5286	0.6455	0.5137	0.6124	0.6009	0.5688	0.6325	0.6423	0.6966	0.5175	0.6708	0.4714	0.6423	0.5137	0.5652	0.5863	0.7360	0.5286	0.5557	0.5960	0.6225	0.5774	0.5876	0.6225	0.6977	0.6021	0.5620	0.5816	0.5620	0.5270	0.5774	0.6124	0.5270	0.6362	0.6177	0.5380	0.5876	0.5669	0.5233	0.5000	0.0000
49	0.6571	0.6292	0.5774	0.7071	0.5960	0.6124	0.5960	0.5620	0.6268	0.6172	0.7360	0.6455	0.5590	0.5380	0.6892	0.5849	0.5849	0.6731	0.6770	0.6562	0.6283	0.6283	0.6225	0.5222	0.6124	0.6325	0.7159	0.6742	0.6124	0.5145	0.5590	0.4588	0.5641	0.5701	0.4873	0.6637	0.6489	0.5669	0.5330	0.6657	0.5641	0.5641	0.4873	0.0000
50	0.6708	0.6325	0.6872	0.4330	0.5701	0.5000	0.6742	0.5303	0.6742	0.5436	0.7265	0.6236	0.5000	0.5916	0.4523	0.6708	0.5701	0.6124	0.7906	0.6455	0.6124	0.6519	0.6708	0.6292	0.5774	0.4767	0.5701	0.6908	0.7071	0.5244	0.5641	0.6030	0.5590	0.5916	0.5839	0.6770	0.5590	0.5839	0.6455	0.6614	0.6124	0.5774	0.6571	0.5641	0.0000
51	0.5863	0.5303	0.5863	0.5774	0.5590	0.0000	0.5995	0.4830	0.5145	0.5941	0.6409	0.5718	0.6614	0.5286	0.5816	0.4330	0.5164	0.5189	0.4472	0.5728	0.5477	0.5728	0.6124	0.5270	0.5893	0.6124	0.6495	0.5941	0.5303	0.5547	0.5145	0.4146	0.5401	0.5590	0.4851	0.6236	0.6250	0.5145	0.5401	0.5774	0.5000	0.5401	0.4851	0.4201	0.5916	0.0000
52	0.5916	0.6030	0.5849	0.5477	0.5270	0.0000	0.5652	0.5137	0.5563	0.5876	0.6063	0.5000	0.5774	0.5130	0.6070	0.5286	0.6009	0.6814	0.6124	0.6236	0.5401	0.5652	0.5620	0.5118	0.6075	0.6589	0.6589	0.6325	0.5774	0.5000	0.6070	0.4859	0.5118	0.5916	0.5528	0.6423	0.6124	0.6177	0.4756	0.5976	0.5563	0.5976	0.5849	0.5590	0.5916	0.5286	0.0000
53	0.5303	0.6009	0.5323	0.6325	0.4282	0.4082	0.6346	0.5154	0.5401	0.5528	0.5669	0.3989	0.7071	0.4851	0.6346	0.4830	0.5423	0.5951	0.5477	0.6250	0.5323	0.5000	0.5286	0.5501	0.6177	0.6860	0.6642	0.6346	0.5286	0.5323	0.6009	0.5145	0.5620	0.6301	0.5728	0.6872	0.6374	0.6642	0.5620	0.5960	0.5620	0.6387	0.5688	0.5528	0.6708	0.5175	0.3430	0.0000
54	0.5701	0.6030	0.5137	0.4472	0.4372	0.0000	0.5528	0.4372	0.5362	0.5123	0.5590	0.4009	0.0000	0.5000	0.4082	0.4841	0.4851	0.5547	0.6455	0.5423	0.5286	0.5816	0.6236	0.5590	0.5809	0.5528	0.5774	0.5849	0.5557	0.4830	0.5401	0.4537	0.4873	0.5380	0.5145	0.5849	0.4697	0.5774	0.5244	0.4743	0.5123	0.6021	0.5270	0.6070	0.4472	0.5303	0.4873	0.4851	0.0000
55	0.5839	0.6455	0.5735	0.7071	0.5960	0.6124	0.6423	0.5960	0.6396	0.6216	0.6009	0.5627	0.4472	0.5244	0.5976	0.5620	0.5701	0.6614	0.6814	0.6689	0.6489	0.6124	0.6637	0.6427	0.6594	0.6172	0.6362	0.6571	0.6225	0.5528	0.6075	0.5477	0.5614	0.6362	0.6801	0.6742	0.6225	0.6455	0.6168	0.5989	0.6079	0.6511	0.6268	0.6396	0.6292	0.5774	0.5976	0.5620	0.4873	0.0000
56	0.5436	0.5204	0.4867	0.5401	0.5735	0.3536	0.6124	0.5130	0.5935	0.5330	0.5774	0.5164	0.3873	0.5244	0.5455	0.5380	0.5123	0.6495	0.6547	0.5620	0.5620	0.6225	0.6268	0.5710	0.5710	0.5233	0.5976	0.5741	0.6325	0.4859	0.5455	0.5362	0.5316	0.5876	0.6225	0.5839	0.4472	0.5455	0.5614	0.5517	0.5710	0.5898	0.6075	0.6307	0.4564	0.5528	0.5455	0.5960	0.4472	0.4778	0.0000
57	0.6571	0.6614	0.5620	0.5401	0.4867	0.4330	0.6325	0.5380	0.5935	0.5839	0.5774	0.5164	0.7071	0.5477	0.5976	0.5000	0.5477	0.5728	0.6268	0.5501	0.5000	0.5590	0.6075	0.5989	0.6511	0.5976	0.6268	0.5641	0.5362	0.6009	0.6172	0.5477	0.5710	0.6455	0.5809	0.6124	0.5244	0.5455	0.5989	0.5614	0.5614	0.6342	0.5563	0.6396	0.6292	0.5270	0.5563	0.5257	0.4472	0.6079	0.5316	0.0000
58	0.7071	0.6708	0.6731	0.7500	0.6708	0.7071	0.6191	0.5774	0.6417	0.5688	0.4830	0.6794	0.6124	0.5863	0.6847	0.6455	0.6055	0.6682	0.5774	0.6583	0.5863	0.4677	0.5137	0.6236	0.6972	0.6236	0.6183	0.6236	0.5000	0.5669	0.5449	0.6124	0.6236	0.6752	0.6847	0.6860	0.6455	0.6417	0.6236	0.5652	0.5528	0.6872	0.6642	0.6770	0.7706	0.6944	0.6642	0.5510	0.6250	0.6124	0.6346	0.5774	0.0000
59	0.7906	0.7319	0.7071	0.5590	0.6547	0.4330	0.7071	0.5774	0.6374	0.5863	0.7792	0.7416	0.5774	0.6455	0.6614	0.6374	0.5863	0.6124	0.5401	0.7071	0.6268	0.6614	0.5863	0.6455	0.7265	0.7071	0.6236	0.6667	0.7071	0.5669	0.7559	0.6814	0.6455	0.6547	0.6124	0.6455	0.6009	0.5590	0.6667	0.7265	0.5528	0.7265	0.6614	0.5774	0.6455	0.6455	0.6268	0.6124	0.6547	0.7454	0.6009	0.6667	0.6455	0.0000
60	0.7706	0.7289	0.5995	0.5916	0.5423	0.4082	0.6301	0.5323	0.6346	0.6009	0.7071	0.6268	0.4472	0.5816	0.5774	0.5995	0.5449	0.6547	0.7638	0.5995	0.5477	0.6417	0.6063	0.6589	0.6070	0.5816	0.5688	0.6770	0.6183	0.5995	0.5652	0.6063	0.5849	0.6642	0.6183	0.6489	0.6177	0.5774	0.6882	0.6177	0.6387	0.6489	0.5528	0.5893	0.5204	0.6614	0.6642	0.6055	0.5303	0.6589	0.5620	0.5849	0.6814	0.5303	0.0000
61	0.5590	0.5590	0.5000	0.4330	0.4841	0.4082	0.6374	0.5688	0.5423	0.6530	0.7440	0.5590	0.6614	0.5154	0.5688	0.5449	0.5000	0.6268	0.5774	0.6055	0.6374	0.6124	0.5816	0.6236	0.6124	0.5941	0.6847	0.6346	0.6124	0.5627	0.5688	0.5449	0.5137	0.6530	0.6183	0.6417	0.6455	0.6562	0.6124	0.6124	0.5652	0.6124	0.5000	0.5774	0.5000	0.5164	0.5154	0.4655	0.4655	0.5893	0.5401	0.5528	0.6455	0.6708	0.5774	0.0000
62	0.7265	0.7246	0.6191	0.6614	0.5916	0.4082	0.6752	0.5728	0.6455	0.5893	0.5825	0.6030	0.5774	0.5449	0.6614	0.5154	0.5816	0.6292	0.6814	0.6952	0.5995	0.5627	0.5728	0.5401	0.5774	0.4841	0.5590	0.5423	0.5728	0.5189	0.6183	0.5916	0.5893	0.5145	0.6191	0.7071	0.6325	0.5728	0.5652	0.5893	0.5401	0.6124	0.5590	0.5816	0.5528	0.5669	0.5941	0.5728	0.5688	0.5270	0.5528	0.6009	0.5547	0.4564	0.5825	0.5976	0.0000
63	0.7071	0.7246	0.6530	0.6770	0.6236	0.6124	0.6236	0.5941	0.6325	0.6225	0.6417	0.6682	0.5916	0.5000	0.6225	0.6236	0.5774	0.5590	0.4564	0.6063	0.4851	0.6589	0.6614	0.6362	0.6814	0.6225	0.6786	0.6225	0.5257	0.5941	0.5620	0.6236	0.6268	0.6021	0.5893	0.6547	0.6177	0.5960	0.6268	0.6726	0.6075	0.6455	0.5774	0.5477	0.6908	0.5557	0.5960	0.5688	0.5652	0.5976	0.6268	0.5976	0.6183	0.6124	0.6236	0.6063	0.5449	0.0000
64	0.7246	0.7071	0.5941	0.4472	0.5000	0.0000	0.5816	0.5423	0.6070	0.6387	0.6847	0.5669	0.0000	0.5137	0.6124	0.4851	0.5557	0.5976	0.5916	0.5557	0.5688	0.5941	0.5652	0.5000	0.5590	0.6455	0.6455	0.6708	0.6236	0.5000	0.6346	0.6183	0.6021	0.6346	0.6346	0.6489	0.5688	0.5620	0.5477	0.6124	0.5244	0.6423	0.4714	0.5590	0.6009	0.5449	0.5257	0.4841	0.5137	0.6124	0.5477	0.5362	0.6642	0.3953	0.5154	0.5995	0.5000	0.5270	0.0000
65	0.8165	0.7559	0.7071	0.7071	0.5477	0.6614	0.6922	0.6519	0.7596	0.5718	0.7993	0.7071	0.4472	0.5641	0.5774	0.6708	0.5774	0.6009	0.7906	0.5839	0.6396	0.7217	0.6651	0.6268	0.5510	0.6455	0.6651	0.7596	0.6571	0.6455	0.5774	0.6504	0.6814	0.6292	0.5222	0.6202	0.6504	0.5590	0.6547	0.6547	0.6814	0.6124	0.5000	0.5718	0.5270	0.5774	0.7071	0.7360	0.5774	0.7319	0.6268	0.7071	0.7416	0.5303	0.4082	0.6872	0.6519	0.6124	0.4564	0.0000
66	0.7071	0.6892	0.6455	0.6124	0.5652	0.5000	0.6770	0.5774	0.6614	0.5701	0.6495	0.5825	0.5000	0.5774	0.6009	0.6063	0.5816	0.6409	0.7906	0.5816	0.6009	0.6417	0.6009	0.5809	0.5123	0.5652	0.6346	0.6177	0.5816	0.5323	0.5735	0.5652	0.5916	0.5620	0.5774	0.6387	0.6063	0.5960	0.5701	0.5916	0.5809	0.5916	0.4859	0.5380	0.4743	0.5423	0.5849	0.6124	0.5137	0.6225	0.5477	0.6325	0.6455	0.5774	0.5688	0.5816	0.4851	0.5893	0.4201	0.3693	0.0000
67	0.5000	0.5303	0.5164	0.5590	0.5164	0.4082	0.5510	0.5000	0.5590	0.5590	0.5547	0.5401	0.6614	0.4629	0.5590	0.3922	0.6202	0.7385	0.5000	0.6504	0.4432	0.4841	0.5164	0.4677	0.5154	0.5345	0.5916	0.5477	0.4432	0.5547	0.5323	0.5164	0.5728	0.6191	0.6268	0.6614	0.6325	0.5774	0.5303	0.5154	0.5590	0.5303	0.5323	0.5323	0.6374	0.4599	0.5477	0.5371	0.5669	0.5863	0.5728	0.5863	0.5401	0.7071	0.6455	0.6045	0.5590	0.5916	0.5175	0.6325	0.5477	0.0000
68	0.6614	0.6667	0.6325	0.6614	0.6325	0.4082	0.6417	0.5345	0.6417	0.5145	0.5669	0.6742	0.6708	0.5590	0.5816	0.5916	0.6124	0.6614	0.6455	0.5774	0.4282	0.5423	0.5688	0.5652	0.6236	0.5995	0.6417	0.5941	0.4851	0.5718	0.4697	0.5941	0.6124	0.5728	0.5774	0.6972	0.6250	0.6374	0.6009	0.5270	0.5270	0.6124	0.6183	0.6301	0.6892	0.5825	0.5995	0.6063	0.5863	0.6562	0.6124	0.5774	0.5345	0.6814	0.6952	0.6355	0.6191	0.5688	0.6325	0.6922	0.6191	0.5189	0.0000
69	0.6742	0.6614	0.5849	0.5477	0.5137	0.4330	0.6562	0.5000	0.6172	0.6268	0.6642	0.6124	0.6614	0.5893	0.5849	0.5941	0.5401	0.6409	0.7792	0.6642	0.6387	0.6589	0.6519	0.6637	0.6726	0.6070	0.6892	0.6614	0.6346	0.5303	0.6589	0.6283	0.6075	0.6801	0.6236	0.7071	0.6455	0.6387	0.6726	0.6637	0.6172	0.6814	0.6070	0.6124	0.5701	0.6495	0.5701	0.5145	0.5257	0.5876	0.5345	0.5345	0.6417	0.5863	0.5688	0.4330	0.5557	0.5960	0.5652	0.7071	0.6177	0.6374	0.5941	0.0000
70	0.6667	0.6236	0.5477	0.7071	0.5154	0.6124	0.6495	0.5669	0.5995	0.6614	0.6409	0.5590	0.5590	0.5449	0.5728	0.6325	0.5774	0.7071	0.7071	0.5774	0.5916	0.6250	0.6847	0.6530	0.6417	0.5916	0.6614	0.6752	0.6417	0.6124	0.6530	0.5863	0.6063	0.6455	0.6495	0.6417	0.5774	0.5941	0.6530	0.5941	0.6183	0.6417	0.5863	0.6860	0.5303	0.5825	0.5323	0.5669	0.4226	0.5286	0.4537	0.5145	0.6814	0.8018	0.6191	0.5510	0.6045	0.6124	0.5863	0.6892	0.6055	0.5825	0.6831	0.4146	0.0000
71	0.7246	0.7416	0.6346	0.6124	0.5145	0.5000	0.6530	0.5863	0.7164	0.5849	0.6583	0.6124	0.4330	0.5941	0.5688	0.5916	0.5154	0.5189	0.8416	0.6495	0.5816	0.6417	0.6770	0.6977	0.6589	0.5286	0.5528	0.6667	0.6124	0.6191	0.6009	0.6124	0.6589	0.5401	0.5816	0.6667	0.5941	0.5528	0.7255	0.6070	0.5735	0.7255	0.5145	0.5893	0.5916	0.6191	0.6972	0.6055	0.5145	0.5849	0.5735	0.5849	0.6325	0.6814	0.5557	0.5916	0.5477	0.5423	0.5590	0.5401	0.5528	0.6374	0.6325	0.5849	0.5323	0.0000
72	0.5863	0.6455	0.5590	0.4472	0.5286	0.3536	0.6960	0.5557	0.6177	0.6177	0.6374	0.5189	0.5000	0.6124	0.6236	0.5816	0.6124	0.6952	0.6124	0.6191	0.6183	0.5816	0.6236	0.6689	0.6882	0.6562	0.6301	0.5528	0.6183	0.6191	0.6417	0.5863	0.5849	0.6589	0.6495	0.5501	0.4851	0.6417	0.6977	0.6589	0.5735	0.7071	0.6177	0.6667	0.6667	0.5728	0.6236	0.5477	0.5286	0.6070	0.5257	0.5501	0.6831	0.6124	0.6250	0.5863	0.6124	0.6689	0.5863	0.7071	0.6009	0.5669	0.6952	0.5893	0.6124	0.5449	0.0000
73	0.7906	0.7071	0.5528	0.5000	0.5528	0.7071	0.5000	0.5303	0.6708	0.5000	0.5303	0.3953	0.5774	0.4082	0.5774	0.5303	0.5590	0.6374	0.7071	0.5000	0.5000	0.5528	0.5916	0.5701	0.5916	0.5477	0.6455	0.5270	0.4714	0.5270	0.5000	0.5244	0.5477	0.5477	0.5590	0.6892	0.6124	0.4714	0.6519	0.5701	0.5916	0.6325	0.4743	0.5270	0.5976	0.5590	0.5270	0.5303	0.3953	0.5477	0.5701	0.6124	0.4677	0.8660	0.5477	0.6374	0.5000	0.5477	0.4226	0.5345	0.4743	0.3536	0.5000	0.6325	0.6374	0.4472	0.5477	0.0000
74	0.6872	0.6519	0.6183	0.6325	0.5941	0.2887	0.6063	0.5000	0.5960	0.4588	0.6374	0.6268	0.5000	0.5652	0.6346	0.6183	0.6063	0.7071	0.7500	0.6860	0.6183	0.5145	0.5528	0.5477	0.6124	0.5774	0.6562	0.6124	0.5893	0.5164	0.5652	0.6124	0.6124	0.6455	0.6124	0.7255	0.6301	0.6387	0.6021	0.6124	0.5590	0.5809	0.5528	0.5362	0.5244	0.5995	0.5735	0.5423	0.5652	0.6614	0.6124	0.6124	0.5688	0.5669	0.5863	0.6124	0.5164	0.6562	0.6070	0.5951	0.5423	0.4599	0.5590	0.5652	0.6831	0.5995	0.6250	0.3062	0.0000
75	0.7416	0.7360	0.7360	0.5774	0.6325	0.4082	0.7706	0.5916	0.7289	0.5863	0.5477	0.7638	0.6124	0.6814	0.5000	0.6124	0.6009	0.6325	0.7071	0.6268	0.5774	0.5976	0.6009	0.6455	0.6667	0.5303	0.6667	0.5303	0.5000	0.5345	0.6374	0.6847	0.6236	0.6614	0.7071	0.7289	0.5000	0.7792	0.6872	0.6009	0.6455	0.7638	0.7500	0.7706	0.5916	0.7071	0.5976	0.6124	0.4226	0.6236	0.5270	0.6009	0.6124	0.6770	0.5774	0.5477	0.5000	0.6847	0.5976	0.7289	0.5401	0.6325	0.6374	0.5863	0.5774	0.6268	0.5000	0.6455	0.4629	0.0000
76	0.5590	0.5863	0.5863	0.5000	0.4372	0.4082	0.5995	0.4841	0.5652	0.5528	0.5916	0.5371	0.6614	0.5154	0.6124	0.5627	0.5627	0.5951	0.6124	0.6325	0.5000	0.6183	0.5728	0.5893	0.5401	0.5449	0.5995	0.5557	0.5728	0.5345	0.6301	0.5557	0.5774	0.5816	0.5303	0.6770	0.6374	0.5557	0.6009	0.5652	0.5270	0.6009	0.5145	0.5000	0.5916	0.4655	0.5286	0.5000	0.5303	0.6124	0.5401	0.5652	0.5718	0.3873	0.5863	0.4282	0.5175	0.5423	0.4472	0.5701	0.4697	0.5000	0.6455	0.4697	0.4629	0.5154	0.5154	0.5000	0.5303	0.5000	0.0000
77	0.6667	0.6708	0.6183	0.6325	0.6183	0.4330	0.6455	0.5270	0.6519	0.5000	0.6731	0.6355	0.4472	0.5000	0.5735	0.6236	0.5401	0.6831	0.7906	0.6752	0.6455	0.6124	0.6283	0.5976	0.6172	0.5620	0.6387	0.6614	0.6562	0.5154	0.5620	0.6070	0.6268	0.5960	0.6124	0.6708	0.5528	0.5735	0.6455	0.6455	0.5976	0.6268	0.6070	0.5590	0.4264	0.6063	0.5257	0.6236	0.5000	0.5976	0.5118	0.6455	0.6124	0.5345	0.5816	0.6183	0.5286	0.6177	0.5137	0.5718	0.5380	0.5825	0.6183	0.5501	0.5477	0.5286	0.6236	0.5000	0.4136	0.4677	0.5688	0.0000
78	0.7289	0.7265	0.6250	0.5000	0.5728	0.4082	0.7071	0.5449	0.6283	0.6489	0.5916	0.5401	0.5000	0.6124	0.5893	0.6124	0.6009	0.6547	0.6708	0.5557	0.6614	0.6752	0.6882	0.6519	0.6423	0.5849	0.7169	0.5501	0.6455	0.5995	0.6489	0.6124	0.5362	0.6387	0.6752	0.6070	0.4697	0.6872	0.6614	0.6021	0.6124	0.6982	0.6177	0.6589	0.5477	0.5774	0.6124	0.6124	0.4372	0.5809	0.4743	0.5809	0.6495	0.6124	0.6495	0.5449	0.5863	0.6387	0.5557	0.6770	0.5286	0.6651	0.6752	0.5652	0.5323	0.6124	0.5145	0.6519	0.6562	0.4082	0.5154	0.5960	0.0000
79	0.5528	0.6124	0.5000	0.6124	0.4851	0.4330	0.6530	0.5145	0.6325	0.6124	0.6614	0.5718	0.7071	0.5557	0.6455	0.5154	0.6183	0.6682	0.6325	0.6960	0.6063	0.5816	0.6177	0.6614	0.7159	0.6786	0.6667	0.6589	0.6063	0.6124	0.6562	0.5528	0.6021	0.7159	0.6530	0.6589	0.6417	0.6972	0.6801	0.6614	0.6021	0.6708	0.5960	0.6177	0.6519	0.5774	0.5620	0.4851	0.5137	0.6021	0.5701	0.5244	0.6124	0.5774	0.5995	0.5303	0.5863	0.6689	0.5688	0.7071	0.6455	0.5345	0.5728	0.4588	0.5510	0.6063	0.4859	0.6124	0.5401	0.6614	0.5286	0.6070	0.6387	0.0000
80	0.7071	0.7071	0.5154	0.5774	0.5401	0.4330	0.5941	0.5557	0.6177	0.6070	0.6301	0.4629	0.5000	0.5286	0.6177	0.5893	0.6301	0.6708	0.5916	0.5154	0.5941	0.5652	0.6455	0.6124	0.6325	0.6562	0.6562	0.6423	0.6387	0.5164	0.6562	0.6124	0.6021	0.6009	0.6667	0.6708	0.5528	0.6070	0.6423	0.6021	0.5477	0.6519	0.5620	0.6708	0.6030	0.5590	0.5528	0.5816	0.4851	0.5809	0.5362	0.5590	0.6495	0.6374	0.5816	0.6124	0.6055	0.6589	0.5270	0.6614	0.6063	0.5345	0.6530	0.6346	0.5590	0.5863	0.5688	0.4714	0.6177	0.6268	0.5286	0.5620	0.6009	0.5270	0.0000
81	0.7071	0.7071	0.5893	0.6325	0.5401	0.4330	0.6667	0.5774	0.6547	0.5774	0.6642	0.5627	0.5590	0.6009	0.6387	0.6063	0.5652	0.6268	0.8018	0.6752	0.6455	0.5893	0.6070	0.6901	0.6726	0.7071	0.6489	0.7246	0.6455	0.5688	0.6489	0.6124	0.6075	0.6423	0.6562	0.7159	0.6124	0.6283	0.6986	0.5774	0.5976	0.7400	0.6283	0.6519	0.7071	0.6614	0.5916	0.5286	0.5257	0.5976	0.5876	0.6268	0.6124	0.6124	0.5423	0.5728	0.6183	0.7164	0.5401	0.6651	0.6283	0.6191	0.7289	0.6021	0.6583	0.6009	0.5774	0.5477	0.5270	0.6374	0.5688	0.5620	0.6667	0.5620	0.4714	0.0000
82	0.7071	0.7071	0.5557	0.6124	0.5257	0.4330	0.6455	0.5401	0.5916	0.5590	0.6124	0.5323	0.5000	0.5270	0.5916	0.5735	0.5774	0.6614	0.7638	0.5688	0.6009	0.6177	0.6070	0.6268	0.5876	0.6283	0.6177	0.6268	0.6519	0.5303	0.6689	0.6009	0.5876	0.5620	0.6489	0.6901	0.6177	0.6021	0.6637	0.6075	0.5563	0.6901	0.5916	0.6362	0.6216	0.5941	0.5130	0.4851	0.5000	0.5976	0.5345	0.5774	0.6417	0.5528	0.5774	0.5423	0.5154	0.6124	0.4588	0.6124	0.5137	0.6055	0.6752	0.5257	0.5423	0.5557	0.6009	0.5528	0.5735	0.5976	0.3638	0.5000	0.5528	0.5652	0.4183	0.4588	0.0000
83	0.6614	0.6667	0.6191	0.6325	0.6055	0.6614	0.6708	0.5774	0.6770	0.5528	0.5825	0.5883	0.8165	0.6191	0.6847	0.6191	0.5449	0.5590	0.8660	0.7071	0.6831	0.6708	0.6495	0.6972	0.6872	0.6374	0.6495	0.7276	0.7071	0.5774	0.6731	0.6124	0.6455	0.6752	0.6583	0.7475	0.6374	0.6847	0.7360	0.6236	0.6667	0.7454	0.6731	0.6860	0.6216	0.6504	0.6183	0.5627	0.5303	0.6562	0.5652	0.6455	0.5883	0.6268	0.6055	0.6504	0.5916	0.7395	0.5774	0.7071	0.6124	0.7206	0.7559	0.6183	0.6292	0.5995	0.6325	0.5774	0.5995	0.6374	0.5477	0.5423	0.6495	0.6183	0.5000	0.4564	0.3953	0.0000
84	0.5590	0.6009	0.4677	0.6325	0.4851	0.4330	0.5941	0.4841	0.5735	0.5501	0.5303	0.5000	0.5477	0.5286	0.5849	0.4697	0.5000	0.5774	0.6814	0.5303	0.5303	0.5652	0.6124	0.6225	0.6225	0.6009	0.5893	0.5620	0.5774	0.5688	0.5893	0.4851	0.5362	0.6346	0.6063	0.6124	0.5380	0.6236	0.6519	0.5362	0.6021	0.6892	0.6070	0.6786	0.6922	0.5303	0.5270	0.4841	0.4022	0.5916	0.4873	0.5000	0.5916	0.6667	0.5774	0.5916	0.6191	0.6689	0.5423	0.6651	0.6183	0.5627	0.6374	0.6124	0.5164	0.5423	0.4697	0.5701	0.6063	0.4677	0.5303	0.5893	0.5145	0.5000	0.4249	0.4867	0.4730	0.4537	0.0000
85	0.5976	0.5669	0.5916	0.5000	0.5590	0.2887	0.6191	0.5627	0.5557	0.6417	0.5825	0.5000	0.4330	0.5916	0.6731	0.6191	0.6268	0.6770	0.6124	0.5825	0.5627	0.5916	0.6455	0.6301	0.6417	0.6583	0.5916	0.5590	0.5916	0.6268	0.5863	0.5164	0.5286	0.6374	0.6055	0.5000	0.4146	0.5449	0.6860	0.5000	0.5816	0.6966	0.6374	0.6731	0.7071	0.6583	0.6124	0.6045	0.5164	0.6752	0.5423	0.5941	0.6922	0.6770	0.6250	0.6409	0.6944	0.7395	0.6124	0.6519	0.6530	0.5883	0.6934	0.6847	0.6045	0.6191	0.5154	0.6124	0.6814	0.5590	0.6055	0.7071	0.5510	0.6583	0.5627	0.5688	0.6250	0.6268	0.4507	0.0000
86	0.7638	0.7319	0.6268	0.6614	0.5627	0.7071	0.6374	0.5345	0.5816	0.5688	0.4818	0.6045	0.7416	0.5995	0.6530	0.6055	0.6731	0.6651	0.8018	0.6831	0.5669	0.5728	0.6374	0.6562	0.6455	0.6614	0.6731	0.6530	0.6063	0.6614	0.6860	0.6325	0.6562	0.6374	0.6952	0.7169	0.6770	0.6250	0.6972	0.6236	0.6346	0.7638	0.6966	0.6966	0.7230	0.6814	0.5863	0.4830	0.6191	0.6562	0.6236	0.6236	0.5718	0.7071	0.6417	0.6355	0.6409	0.6530	0.5916	0.7638	0.6952	0.6202	0.7071	0.6374	0.6268	0.6952	0.6583	0.6124	0.6325	0.8018	0.5669	0.6847	0.6960	0.6455	0.5449	0.5688	0.4851	0.5323	0.5652	0.6325	0.0000
88	0.6268	0.5976	0.5477	0.5774	0.4677	0.2887	0.5774	0.5164	0.5688	0.4372	0.5825	0.5976	0.6614	0.5164	0.5154	0.5627	0.5669	0.6045	0.7638	0.5510	0.5164	0.4830	0.5774	0.5557	0.5286	0.5916	0.5916	0.6124	0.5477	0.5976	0.5154	0.5916	0.6301	0.4507	0.5164	0.6752	0.5995	0.5303	0.6183	0.5286	0.5000	0.6530	0.5590	0.5449	0.6124	0.5774	0.5303	0.4599	0.5000	0.6642	0.5941	0.5816	0.6614	0.6770	0.5863	0.5510	0.5976	0.5863	0.5669	0.5701	0.5816	0.5669	0.5547	0.5863	0.5883	0.5303	0.6250	0.5701	0.5000	0.7071	0.5323	0.5590	0.6547	0.6325	0.4830	0.5145	0.4841	0.6191	0.5688	0.5590	0.4830	0.0000
89	0.6547	0.6268	0.5323	0.5590	0.5000	0.5000	0.5774	0.5345	0.6063	0.5145	0.5825	0.5510	0.5000	0.5477	0.5590	0.5825	0.5976	0.6614	0.7638	0.5510	0.4629	0.5627	0.6325	0.5557	0.5000	0.5627	0.6191	0.6250	0.5627	0.5164	0.5154	0.5000	0.5557	0.4841	0.5774	0.6063	0.5423	0.5590	0.6063	0.5145	0.5000	0.6063	0.5449	0.5590	0.5641	0.5669	0.5590	0.5547	0.4282	0.6063	0.5286	0.5816	0.6292	0.7559	0.6063	0.5371	0.6355	0.6495	0.5669	0.5839	0.5590	0.5510	0.5718	0.6374	0.5883	0.5728	0.5774	0.5244	0.5825	0.6708	0.5477	0.5916	0.5669	0.5916	0.3873	0.5145	0.5303	0.6055	0.5286	0.4841	0.5863	0.4507	0.0000
90	0.6374	0.6124	0.4330	0.7071	0.5000	0.0000	0.5590	0.4655	0.5286	0.4851	0.5774	0.5345	0.0000	0.4851	0.5145	0.5154	0.5000	0.6504	0.7071	0.5590	0.5164	0.5303	0.5863	0.5528	0.5137	0.5995	0.5590	0.6124	0.5557	0.5669	0.5286	0.5000	0.5774	0.4507	0.5688	0.6124	0.5286	0.5137	0.6009	0.5000	0.4859	0.6124	0.5286	0.5270	0.5701	0.5303	0.5557	0.5000	0.4677	0.5774	0.5137	0.5137	0.6325	0.5976	0.5557	0.5477	0.5547	0.5941	0.5286	0.4743	0.5303	0.4385	0.5345	0.5449	0.5477	0.5000	0.6055	0.4677	0.5557	0.7500	0.4830	0.5000	0.6191	0.5627	0.5145	0.4330	0.4410	0.5189	0.4841	0.5477	0.4830	0.2988	0.4082	0.0000