

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL DURANTE A
MICROPROPAGAÇÃO DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa*
Gomes) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E SSR

Autora: Géssica Ferreira da Costa
Orientadora: Dr.^a Maria Andréia Corrêa Mendonça
Coorientador: Dr. Pablo Diego Silva Cabral

RIO VERDE – GO

Março 2018

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL DURANTE A
MICROPROPAGAÇÃO DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa*
Gomes) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E SSR**

Orientadora: Dr.^a Maria Andréia Corrêa Mendonça

Coorientador: Dr. Pablo Diego Silva Cabral

Dissertação apresentada, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde

RIO VERDE – GO

Março 2018

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

CG392a Costa, Géssica
Avaliação da variação somaclonal durante a micropropagação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) por meio de marcadores moleculares ISSR e SSR / Géssica Costa; orientadora Maria Andréia Mendonça; co-orientadora Pablo Diego Cabral. -- Rio Verde, 2018.
41 p.

Dissertação (Graduação em Mestrado em Biodiversidade e Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, 2018.

1. Estabilidade genética. 2. Fidelidade clonal. 3. Cultura de tecidos vegetais. 4. Diversidade genética. 5. Organogênese. I. Mendonça, Maria Andréia, orient. II. Cabral, Pablo Diego, co-orient. III. Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL DURANTE A
MICROPROPAGAÇÃO DE MANGABEIRA (*HANCORNIA
SPECIOSA* GOMES) POR MEIO DE MARCADORES ISSR E
SSR

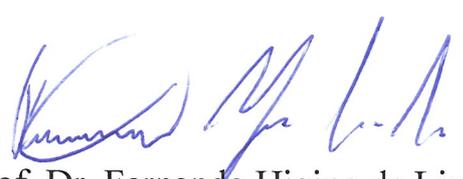
Autora: Géssica Ferreira da Costa
Coorientador: Pablo Diego Silva Cabral

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

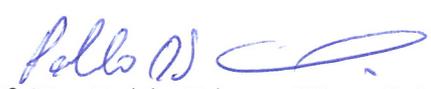
APROVADA em 28 de março de 2018.



Prof. Dr. Raoni Ribeiro Guedes
Fonseca Costa
Avaliador externo
UEG / Quirinópolis



Prof. Dr. Fernando Higino de Lima e
Silva
Avaliador interno
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Pablo Diego Silva Cabral
Presidente da banca
IF Goiano / Rio Verde

DEDICO ESTE TRABALHO:

A minha família em primeiro lugar, em especial minha mãe, que sempre esteve ao meu lado dando força, carinho, além do apoio incondicional. A minha orientadora e ao meu coorientador que souberam passar seus conhecimentos e guiar na direção correta para que esse crescimento fosse possível. E a todos os amigos que estiveram comigo nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me concedido a graça de vencer mais essa etapa.

Aos meus pais Darcy Ferreira da Silva e Eliete Aparecida da Costa Silva, por todo o apoio concedido durante o decorrer da minha vida pela compressão em todos os momentos, assim como todo o amor, carinho que foram essenciais.

A minha orientadora Dr.^a Maria Andréia Corrêa Mendonça pelos valiosos ensinamentos, pela disponibilidade de tempo para esclarecer sempre as dúvidas que surgiam. Aprendi e amadureci muito ao longo desses dois anos de mestrado, serei sempre grata e levarei seus ensinamentos comigo.

Ao meu coorientador Dr. Pablo Diego Silva Cabral, pela confiança, por todo o conhecimento passado durante o mestrado, pela paciência que sempre teve comigo. Na verdade, considero que tive a sorte de ter dois orientadores no mestrado, portanto meus agradecimentos pelos ensinamentos, pela confiança depositada, assim como todo o tempo, carinho e paciência que tiveram comigo se estende aos dois, o meu crescimento durante esses dois anos foi graças aos ensinamentos que me passaram.

A Dr.^a Juliana Silva Rodrigues Cabral, que me ensinou sobre a técnica de micropropagação de mangabeiras, assim como toda paciência e dedicação ao longo desse ensinamento.

Ao Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais (LCTV) e ao Laboratório de Biotecnologia, pelo espaço concedido e por todo o amparo para desenvolver esse trabalho

A dois amigos em especial que foram os incentivadores para começar essa etapa da minha vida, Valquíria e Roniel, só tenho a agradecer por todo o apoio, o carinho e força que me deram para conseguir concluir, foi um caminho cheio de desafios, mas com a companhia de vocês a caminhada ficou mais leve e possível de ser levada até o final.

Ao Wallaf, Geynniane, Eliane, que sempre estiveram presentes no Laboratório de Biotecnologia, dando sempre apoio e ajuda, a Geynniane em especial que me passou seus conhecimentos de prática em laboratório.

A Tatiele, Leandro, José, Thaís, que me ajudaram quando possível no laboratório, e essa ajuda foi muito valiosa para o andamento do meu trabalho.

A minha turma da pós-graduação composta pelo Antonio, Carol, Eliane, Gabriella, Isis, Lucas, Yasmim, Marcelino, Raunder, Roniel, Seixas, Valquíria, Wallaf, todos tiveram um papel muito especial nessa trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, pela formação e pela oportunidade que me foi concedida.

Muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho.

BIOGRAFIA

Géssica Ferreira da Costa filha de Darcy Ferreira da Silva e Eliete Aparecida da Costa Silva. Natural da cidade de Quirinópolis, nascida no dia 28 de outubro de 1993 no Estado de Goiás.

Ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Goiás em 2012 e graduou-se em março de 2016. Iniciou no curso de mestrado no programa de pós-graduação em Biodiversidade e Conservação pelo Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde em 2016, previsto para concluir em 2018.

Sumário

AGRADECIMENTOS	vi
BIOGRAFIA.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL DURANTE A MICROPROPAGAÇÃO DE MANGABEIRA (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E SSR.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 Material vegetal.....	7
2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	7
2.2.1 Organogênese direta.....	7
2.2.2 Organogênese indireta.....	8
2.3 Análise da variação somaclonal utilizando marcadores moleculares	8
2.3.1 Extração de DNA	9
2.3.2 Análise por Marcadores SSR	10
2.3.3 Análise por Marcadores ISSR.....	11
2.3.4 Análises dos dados moleculares e da diversidade genética	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
3.1 Análises da variação somaclonal utilizando marcadores moleculares.....	13
3.2 Análises de diversidade genética	15
4. CONCLUSÃO	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Avaliação da variação somaclonal durante a micropropagação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) por meio de marcadores moleculares ISSR e SSR

- Figura 1.** Padrão de bandas obtido pelos *primers* ISSR (A) e SSR (B) em gel de agarose 1,5%, comparando a matriz (C2) que se refere a matriz 2 de Caçu com seus respectivos 6 subcultivos, representados pelos números 1 ao 6, para os *primers* UBC 851 (P14) e HS 08 (P28).....13
- Figura 2.** Dendrograma representando a distância genética entre as matrizes de mangabeiras dos três locais, para os *primers* ISSR, obtido pelo complemento do Índice de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA.....20
- Figura 3.** Dendrograma representando a distância genética entre as matrizes de mangabeiras dos três locais, para os *primers* SSR, obtido pelo complemento do Índice Ponderado e pelo agrupamento UPGMA.....21

ÍNDICE DE TABELAS

Avaliação da variação somaclonal durante a micropropagação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) por meio de marcadores moleculares ISSR e SSR

Tabela 1. Plântulas matrizes de mangabeiras micropropagadas e seus respectivos subcultivos.....09

Tabela 2. Primers ISSR selecionados para avaliação da variação somaclonal nas plântulas de mangabeiras micropropagadas e para a análise da diversidade genética entre as plântulas matrizes.....16

Tabela 3. Primers SSR selecionados para avaliação da variação somaclonal nas plântulas de mangabeiras micropropagadas e para a análise da diversidade genética entre as plântulas matrizes.....17

Tabela 4. Matriz de dissimilaridade genética entre os genótipos de mangabeira, acima da diagonal principal marcadores ISSR e abaixo SSR.....19

AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL DURANTE A
MICROPROPAGAÇÃO DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa*
Gomes) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E SSR

AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO SOMACLONAL DURANTE A
MICROPROPAGAÇÃO DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa*
Gomes) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E SSR

RESUMO

Variação somaclonal refere-se às mudanças genéticas e epigenéticas que podem ocorrer nas plantas regeneradas por meio de técnicas de cultura de tecidos vegetais. No presente trabalho, avaliou-se a fidelidade clonal e a diversidade genética de plântulas de mangabeira micropropagadas, utilizando marcadores moleculares ISSR e SSR. Utilizou-se duas vias de micropropagação, organogênese direta e indireta, as quais foram subcultivadas a cada trinta dias, totalizando, ao final, seis subcultivos realizados. Para verificar a ocorrência de variação somaclonal foi realizada a análise dos géis visualmente, sendo essa ocorrência determinada pela existência ou não de polimorfismo no padrão de bandas geradas para cada um dos loci estudados pelos marcadores ISSR e SSR, sempre comparando as plântulas/calos subcultivados com a sua respectiva plântula matriz. Para análise da diversidade genética foi realizado o cálculo da matriz de dissimilaridade obtido pelo complemento do Índice de Jaccard (ISSR) e pelo complemento do Índice Ponderado (SSR), utilizando o programa GENES. Posteriormente foi realizado o agrupamento hierárquico (UPGMA), utilizado para traçar um dendrograma. Assim como também se calculou o coeficiente de correlação cofenética (CCC) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). Os resultados mostraram a inexistência de variação somaclonal em ambas as vias de regeneração, direta e indireta, podendo ser explicada essa ausência pela própria constituição genética dos indivíduos, assim como o uso de baixas concentrações de fitorreguladores. Já em relação a diversidade genética foi observado baixo valor de dissimilaridade entre as matrizes analisadas, sendo o valor mínimo encontrado para ISSR de 0,016 e SSR de 0, indicando baixa variabilidade genética entre os indivíduos avaliados.

Palavras-chave: Estabilidade genética, fidelidade clonal, cultura de tecidos vegetais, diversidade genética, organogênese

SOMACLONAL VARIATION ASSESSMENT IN
MICROPROPAGATED MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)
USING MOLECULAR MARKERS (ISSR AND SSR)

ABSTRACT

Somaclonal variation refers to genetic and epigenetic changes that can occur regenerated plants by vegetal tissue culture techniques. The present work evaluated the clonal fidelity and the genetic diversity of micropropagated mangabeira seedlings using ISSR and SSR molecular markers. There were used direct and indirect shoot organogenesis strategies for micropropagation where obtained plantlets were subcultured every 30 days, totalizing six subcultures performed. Visual analysis of the electrophoretic pattern for selected SSR and ISSR markers was performed to assess the occurrence of somaclonal variants, by the existence or not of polymorphism in the amplified locus, comparing the subcultivated seedlings/calli with their respective parent plant. For genetic diversity analysis, the dissimilarity matrix obtained by the complement of the Jaccard Index (ISSR) and the complement of the Weighted Index (SSR) were calculated using the GENES software. Hierarchical grouping (UPGMA) was used to plot a dendrogram. The cophenetic correlation coefficient (CCC) and the polymorphic information content (PIC) were also calculated. Homogenous plantlets (absence of somaclonal variation) were obtained in both, direct and indirect, regeneration pathways. These results can be explained by the genetic constitution of the individuals, as well as, by the use of low phytohormones concentrations during the subcultures. For genetic diversity, a low dissimilarity value was observed among the analyzed matrices, with a minimum value found for ISSR of 0.016 and SSR of 0, indicating a low genetic variability among the evaluated individuals.

Key words: Genetic stability, clonal fidelity, plant tissue culture, genetic diversity, organogenesis

1. INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), pertencente à família Apocynaceae, é uma espécie frutífera natural nos Tabuleiros Costeiros, Baixada Litorânea e Cerrado do Brasil (SILVA JUNIOR et al., 2015). É uma árvore de porte médio com altura variando entre 4 m e 7 m, podendo alcançar até 15 m. Encontra-se naturalmente em áreas de vegetação aberta como os cerrados, cerradões, tabuleiros e restingas, onde predomina solos arenosos (SOARES et al., 2005; SILVA JUNIOR et al., 2015).

É uma espécie alógama, que apresenta autoincompatibilidade, contribuindo para uma maior variabilidade genética, havendo a necessidade de genótipos diferentes e polinizadores para a fecundação cruzada (DARRAULT; SCHLINDWEIN, 2003; SILVA JUNIOR et al., 2015).

Seu fruto é apreciado por seu sabor e aroma, podendo ser consumido *in natura*, ou utilizado para produção de doces, sorvetes, compotas, sucos, geleias, licor, xarope, vinagre, apresentando potencial para exploração comercial (MOURA et al., 2011; JIMENEZ et al., 2015; SILVA JUNIOR et al., 2015). Além do valor econômico a mangabeira apresenta potencial farmacológico. Estudos demonstram que a espécie possui compostos bioativos que reduzem a concentração de glicose no sangue, podendo ser utilizada no tratamento de diabetes (PEREIRA et al., 2015) e seu látex possui atividade anti-inflamatória (MARINHO et al., 2011).

Devido a redução da área de sua ocorrência natural, a mangabeira representa uma das espécies frutíferas mais ameaçadas pela erosão genética no Brasil, salientando a necessidade de meios eficientes para conservação dessa espécie (MOURA et al., 2011; SÁ et al., 2011).

Apesar do potencial econômico e farmacológico, a exploração da mangabeira ainda é predominantemente extrativista, devido à falta de plantios comerciais que é dificultado por conta da própria característica da espécie, que apresenta sementes recalcitrantes e perdem a viabilidade quando armazenadas (BASTOS et al., 2007; SOARES et al., 2007). Soares et al. (2007) sugerem que a produção de mudas de qualidade e em grande escala seria uma alternativa viável para que seja realizada a implantação desses plantios comerciais. Diante disso, a micropropagação vem sendo utilizada como uma técnica promissora para gerar grande número de plantas saudáveis e uniformes (BORTHAKUR et al., 1999; THORPE, 2007). É uma técnica de propagação clonal rápida, que pode ser utilizada na conservação de germoplasma, produção de

plantas saudáveis, multiplicação de material em curto período de tempo, utilizando um espaço físico reduzido (XAVIER; OTONI, 2009).

No entanto, apesar da micropropagação ser um método de clonagem de plantas *in vitro* em que se espera que as plantas obtidas por meio da cultura de tecidos sejam idênticas a planta mãe, ao longo dos subcultivos podem ocorrer instabilidades genéticas, denominadas de variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Este fenômeno refere-se às alterações genéticas e epigenéticas nas plantas regeneradas a partir da cultura de tecidos vegetais (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; NWAUZOMA; JAJA, 2013). As causas da variação somaclonal ainda não estão totalmente esclarecidas (BAIRU et al., 2011), embora fatores como o número e a duração dos subcultivos, os métodos de propagação, o genótipo, a natureza do tecido utilizado, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento, podem determinar a ocorrência dessas variações (BAIRU et al., 2011; NWAUZOMA; JAJA, 2013; KRISHNA et al., 2016).

A variação somaclonal pode ser utilizada, com algum sucesso, como fonte de variabilidade por melhoristas de plantas, no entanto é um problema para a micropropagação comercial, uma vez que, nesses casos a manutenção da fidelidade genética é desejável (SCHELLEBAUM et al., 2008; NWAUZOMA; JAJA, 2013). Sendo assim, a verificação da estabilidade genética após os sucessivos subcultivos realizados durante a micropropagação se faz necessária, para evitar resultados inesperados.

Diferentes técnicas vêm sendo utilizadas para monitorar a ocorrência de variação somaclonal, dentre as quais podem ser citadas: contagem e análise de alterações numéricas e estruturais em cromossomos mitóticos e meióticos, citometrias de fluxo e imagem, tamanho dos estômatos, número de cloroplastos nas células-guarda e utilização de marcadores moleculares (BENNICI et al., 2004).

Os marcadores moleculares, que estão entre essas técnicas, vêm sendo amplamente utilizados para detectar a ocorrência de variação somaclonal (RATHORE et al., 2014; PENG et al., 2015; SAHA et al., 2016; SOARES et al., 2016a). Dentre os marcadores moleculares de DNA podemos destacar o SSR e o ISSR, pela maior confiabilidade e repetibilidade dos dados e pelo alto grau de polimorfismo (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), também conhecidos como microssatélites, são sequências simples repetidas em *tandem*. Para obtenção dos marcadores é necessário à amplificação dos microssatélites via PCR (Reação em Cadeia

da Polimerase), utilizando *primers* específicos para as regiões do DNA que flanqueiam os microssatélites. Portanto para realização de trabalhos envolvendo o uso de marcadores SSR, é necessário, primeiramente o desenvolvimento de *primers* específicos para a espécie em estudo. As principais vantagens dos marcadores SSR são a codominância, o alto nível de polimorfismo que pode ser detectado, a simplicidade técnica e a alta reprodutibilidade (FALEIRO, 2007; BORÉM; CAIXETA, 2009).

Já os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são fragmentos de DNA amplificados via PCR utilizando *primers* únicos construídos a partir de sequência de microssatélites, amplificados via PCR. As principais vantagens do ISSR são a geração de grande número de bandas informativas por reação e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para construção do primer utilizado (FALEIRO, 2007).

Considerando-se que não há trabalhos envolvendo a ocorrência de variação somaclonal nessa espécie, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de variação somaclonal nas plântulas de mangabeiras micropropagadas via organogênese direta e indireta, a fim de verificar o número de subcultivos que podem ser realizados para assegurar a estabilidade genética ou fidelidade clonal. Além disso, foi realizada análise da diversidade genética das plântulas micropropagadas utilizadas nesse estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram coletados, em outubro de 2016, frutos de diferentes plantas de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em três localidades do estado de Goiás: (1) fazenda Gameleira no município de Montes Claros (latitude 19°53'S, longitude 44°25'W e altitude de 749 m); (2) fazenda Água Amarela no município de Ouroana (latitude 18°11'824S, longitude 50°34'180W e altitude de 656 m) e (3) fazenda Jatobá no município de Caçu (latitude 18° 781'S, longitude 52° 58,307'W e altitude de 508 m). Todo o material vegetal coletado foi acondicionado em caixas plásticas e levado ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) do IF Goiano – *Campus* Rio Verde, para o desenvolvimento dos experimentos de propagação *in vitro*.

2.2 Estabelecimento *in vitro*

Os frutos coletados foram despulpados manualmente com o auxílio de uma peneira de malha de alumínio (número 30). Após, realizou-se a desinfestação das sementes obtidas dos frutos de mangabeiras, por meio da imersão das sementes em recipiente com água corrente contendo três gotas de Tween 80 durante 30 minutos. Em seguida, as sementes foram deixadas em álcool 70 % (v/v) por 1 min e por 20 minutos em solução hipoclorito de sódio (20 %), seguido de triplo enxágue em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada.

Após essas etapas, foram realizados experimentos de micropropagação empregando duas metodologias: organogênese direta e organogênese indireta.

2.2.1 Organogênese direta

As sementes previamente desinfestadas foram transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio de cultivo, sendo colocado 1 semente por tubo e identificados de acordo com cada local de origem das plântulas matrizes. O meio de cultivo utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado para a metade da concentração original dos sais (MS ½), suplementado com vitaminas propostas por White (1943), 30 g L⁻¹ de sacarose e 3,5 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03

antes da autoclavagem. Os tubos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25 ± 3 °C, umidade relativa de 45 a 46% e radiação fotossintética ativa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para a obtenção de plântulas preestabelecidas *in vitro*. A cada 30 dias foram realizados subcultivos, totalizando ao final 6 subcultivos.

2.2.2 Organogênese indireta

Para a indução de calos, foram retiradas folhas das dez plântulas matrizes selecionadas inicialmente e submetidas ao cultivo em meio MS ½ suplementado com 1 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 2,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), suplementado com vitaminas propostas por White (1943), 30 g L⁻¹ de sacarose e 3,5 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,03$ antes da autoclavagem.

Os materiais foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas com temperatura de 25 ± 3 °C, umidade relativa de 45 a 46 % e radiação fotossintética ativa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram realizados 6 subcultivos a cada 30 dias, utilizando o meio MS ½ como descrito anteriormente.

2.3 Análise da variação somaclonal utilizando marcadores moleculares

Para avaliar a ocorrência de variação somaclonal na micropropagação de mangabeiras, após a emergência das plântulas, das 10 que foram estabelecidas inicialmente *in vitro*, foram selecionadas, visualmente (aquelas que possuíam maior número de folhas e maior comprimento do caule), três plântulas de cada um dos três locais coletados, as quais foram consideradas as matrizes para o restante dos experimentos. Os segmentos nodais e os calos obtidos das plântulas foram subcultivados 6 vezes em intervalos de 30 dias.

Devido à perda de material por contaminação, não foi possível selecionar as mesmas matrizes para as plântulas (via direta) e para os calos (via indireta). Dessa forma, na tabela 1, estão indicadas as plântulas matrizes e os respectivos subcultivos analisados.

Tabela1. Plântulas matrizes de mangabeiras micropropagadas e seus respectivos subcultivos

Plântulas matrizes		Subcultivos					
Plântulas (Organogênese direta)	Montes Claros 1	1	2	3	4	5	6
	Montes Claros 2	1	2	3	4	5	6
	Montes Claros 3	1	2	3	4	5	6
	Caçu 3	1	2	3	4	5	6
	Caçu 7	1	2	3	4	5	6
	Caçu 9	1	2	3	4	5	6
	Ouroana 1	1	2	3	4	5	6
	Ouroana 7	1	2	3	4	5	6
	Ouroana 8	1	2	3	4	5	6
Calos (Organogênese indireta)	Montes Claros 1	1	2	3	4	5	6
	Montes Claros 2	1	2	3	4	5	6
	Montes Claros 3	1	2	3	4	5	6
	Caçu 1	1	2	3	4	5	6
	Caçu 2	1	2	3	4	5	6
	Caçu 7	1	2	3	4	5	6
	Ouroana 1	1	2	3	4	5	6
	Ouroana 7	1	2	3	4	5	6
	Ouroana 8	1	2	3	4	5	6

2.3.1 Extração de DNA

Foi realizada a extração de DNA de cada plântula matriz e dos seus respectivos subcultivos para cada uma das vias, sendo utilizadas folhas/calos das plântulas de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações, as quais foram, o aumento da concentração de β -mercaptoetanol, que era utilizado de acordo com o protocolo a 0,2% e foi utilizado no presente trabalho a 1%, assim como foi repetido por mais uma vez a etapa de adição de clorofórmio: álcool isoamílico.

Cerca de 200 a 300 mg de folhas foram trituradas dentro de microtubos com o auxílio de pistilos, adicionando 700 μ L de tampão de extração, constituído de 2% v/v de CTAB, 1,4 M de NaCl₂, 20 mmol L⁻¹ de EDTA, 100 mM de Tris-HCl a pH 8,0; 2% p/v

de Polivinilpirrolidona (PVP) e 1% v/v de β -mercaptoetanol. Em seguida, o material foi homogeneizado em vórtex por aproximadamente 20 segundos e incubados em banho-maria a 65° C por aproximadamente 1 hora, sendo homogeneizados manualmente (por inversões) a cada 10 minutos. Em seguida foi adicionado a mistura 600 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), centrifugadas durante 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Novamente foi adicionado 600 μ L Clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), as amostras foram agitadas com suaves inversões durante 10 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm. Foi transferida a fase aquosa (superior) para outro tubo (500 μ l) e adicionado 500 μ l de isopropanol gelado ao sobrenadante (respeitando a proporção de 1:1 de isopropanol: sobrenadante), para precipitar o DNA, foi homogeneizado suavemente, por inversão do tubo (1 minuto) e deixado por 2 horas no freezer a -20°C. Após essa etapa, as amostras foram levadas a centrífuga por 10 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e lavou-se o precipitado uma vez com etanol 70% e outra vez com etanol 95%. Após seco a temperatura ambiente, esse precipitado foi ressuscitado em 200 μ L de tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA em pH 8,0), contendo RNase na concentração final de 40 μ g mL⁻¹ e incubado em banho-maria a 37 °C por uma hora e meia.

A quantificação do DNA extraído foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop™, e a qualidade do DNA foi checada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed™ (Biotium) utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida para comparação. Quando necessário, as amostras foram diluídas para 120 ng μ L⁻¹.

2.3.2 Análise por Marcadores SSR

Foram testados 20 *primers* SSR para mangabeira (RODRIGUES et al., 2015), esses *primers* foram escolhidos porque apresentaram polimorfismo e foram úteis em estudos de diversidade genética em populações naturais dessa espécie. Foi realizado um teste inicial desses *primers*, por meio da realização de reações de PCR com o DNA genômico das plântulas escolhidas como matrizes e a partir deste teste 16 foram selecionados por apresentarem bandas mais nítidas (Tabela 3).

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25 μ L, contendo tampão (5 mM de MgCl₂, 50 mM de Tris/HCl (pH 9,0), 50 mM de NaCl), dNTP (0,2

mM), 1 μ M de cada *primer*, 1,25 unidades de Taq-polimerase (GoTaq®) e 120 ng de DNA.

As amplificações foram conduzidas em termociclador (BioRad T100™), de acordo com as seguintes condições: um ciclo a 94 °C por 3 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 50-58 °C (de acordo com cada primer, tabela 3) por 1 min, 72 °C por 1 min, uma extensão final a 72 °C por 7 min e resfriado a 4°C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium) em tampão TBE 1X, a 100 volts por aproximadamente três horas. Foi usado o marcador molecular de 100 pares de bases (100 bp DNA Ladder Promega). Terminada a eletroforese, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, utilizando o sistema de fotodocumentação L.PIX (Loccus Biotecnologia).

2.3.3 Análise por Marcadores ISSR

Foram testados 20 *primers* ISSR (COSTA et al., 2015; JIMENES et al.; 2015; SOARES et al., 2016b), os quais também foram escolhidos porque apresentaram polimorfismo e foram úteis em estudos de diversidade genética em populações naturais dessa espécie. A partir do teste inicial desses 20 *primers*, 15 foram selecionados por apresentarem um perfil de amplificação de melhor qualidade verificada através da visualização de bandas mais nítidas (Tabela 2).

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25 μ L, contendo tampão (5 mM de MgCl₂, 50 mM de Tris/HCl (pH 9,0), 50 mM de NaCl), dNTP (0,2 mM), 1 μ M de cada *primer*, 1,25 unidades de Taq-polimerase (GoTaq® Promega) e 120 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador BioRad (T100™) onde as amostras foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 3 min, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 1 min, 50-60,7°C (de acordo com cada primer, tabela 2) por 1 min, 72°C por 1 min, uma extensão final a 72°C por 7 min e resfriado a 4°C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium) em tampão TBE 1X, a 100 volts por aproximadamente três horas. Foi usado o marcador molecular de 100 pares de bases (100bp DNA Ladder Promega). Terminada a eletroforese, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, utilizando o sistema de fotodocumentação L.PIX (Loccus Biotecnologia).

2.3.4 Análises dos dados moleculares e da diversidade genética

A análise dos géis foi realizada visualmente após a eletroforese, de forma que a ocorrência de variantes somaclonais nas amostras estudadas foi determinada pela existência ou não de polimorfismo no padrão de bandas geradas para cada um dos locos estudados pelos marcadores ISSR e SSR, sempre comparando as plântulas/calos subcultivadas com a sua respectiva plântula matriz.

Para quantificar a diversidade genética entre as plântulas matrizes, foram codificadas as bandas produzidas na amplificação pelos *primers* ISSR resultando em uma matriz binária, em que 1 significa presença de bandas e 0 ausência de bandas. Já para os *primers* SSR, foi gerado uma matriz contendo 1, 2 e 3 de acordo com o número de alelos para cada loco, em que a codificação 11, 22 e 33 se refere aos homozigotos e 12, 13 e 23 aos heterozigotos. O cálculo da matriz de dissimilaridade foi obtido pelo complemento do Índice de Jaccard e pelo complemento do Índice Ponderado, utilizando para isso o programa GENES (CRUZ, 2016). Posteriormente foi realizado o agrupamento hierárquico *Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA), utilizado para traçar um dendrograma. Para verificar a consistência do agrupamento, calculou-se o coeficiente de correlação cofenética (CCC), com auxílio do programa R, usando o pacote cluster (MAECHLER, 2010).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado para cada primer, com o intuito de estimar a eficiência dos *primers* na indicação de polimorfismo entre dois indivíduos. Para os dados binários, o PIC foi calculado usando a seguinte fórmula $PIC_i = \sum 2f_i(1 - f_i)$, em que f_i é a frequência do alelo amplificado (presença de banda). Para os dados codominantes (SSR), foi utilizada a seguinte fórmula $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$, em que P_i é a frequência do i -ésimo alelo do j -ésimo loco.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises da variação somaclonal utilizando marcadores moleculares

A análise do padrão de bandas geradas pelos marcadores SSR e ISSR não revelaram a presença de variação somaclonal durante os seis subcultivos realizados, quando comparados com suas matrizes (Figura 1). Esses resultados encontrados no presente trabalho estão condizentes com o objetivo da micropropagação, que segundo Lal et al. (2015), é a produção de plantas geneticamente iguais as suas matrizes, de modo que a integridade genética da planta matriz/doadora seja mantida nas progênes micropropagadas.

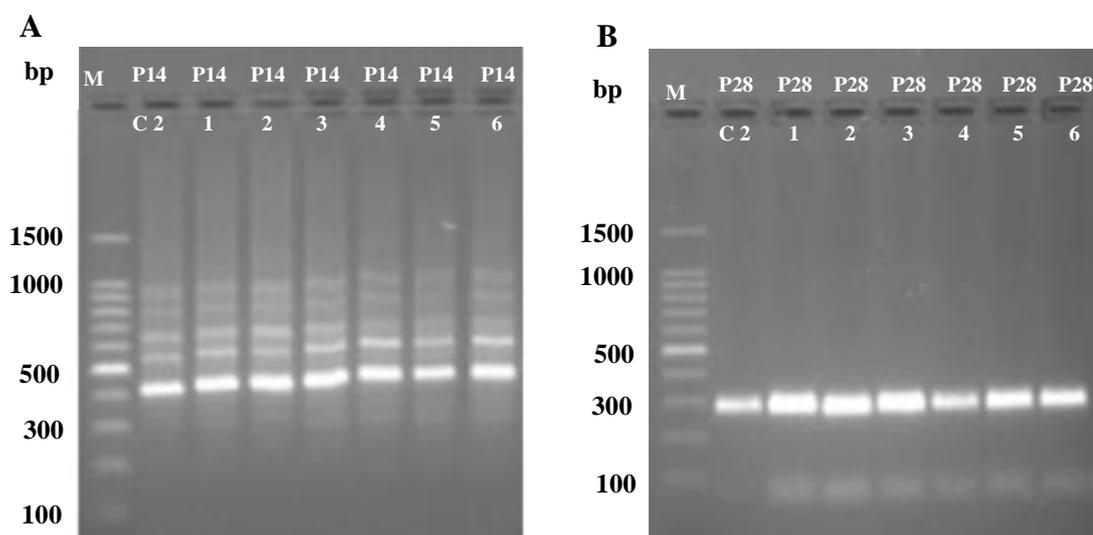


Figura 1. Padrão de bandas obtido pelos *primers* ISSR (A) e SSR (B) em gel de agarose 1,5%, comparando a matriz (C2) que se refere a matriz 2 de Caçu com seus respectivos 6 subcultivos, representados pelos números 1 ao 6, para os *primers* UBC 851 (P14) e HS 08 (P28).

Diversos tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados com a finalidade de identificar variação somaclonal. Em trabalhos realizados com cana-de-açúcar micropropagadas, Jain et al. (2005), analisando 9 cultivares por meio do uso de marcadores RAPD, não encontraram nenhuma variação somaclonal, assim como Hsie et al. (2015), que analisaram duas cultivares durante 15 subcultivos por meio de marcadores ISSR. Esses resultados estão em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho, em que não foi identificada variação somaclonal nos locos analisados.

Em trabalhos envolvendo outras espécies de plantas cultivadas *in vitro* ou micropropagadas, tem sido relatada uma baixa frequência de variação somaclonal. Esse fato pode ser verificado no estudo conduzido por Bathia et al. (2009), que avaliaram a fidelidade genética de 45 plantas micropropagadas de Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) derivadas de três explantes diferentes por marcadores ISSR e apenas um dos clones derivados de folhas apresentou algum grau de diferenciação, os demais foram todos geneticamente idênticos a sua planta mãe/matriz.

Avaliações de variação somaclonal conduzidas em 20 plantas de *Platanus acerifolia* Willd mantidas *in vitro*, subcultivadas a cada dois meses durante oito anos, demonstraram 91% de similaridade com as matrizes (HUANG et al., 2009).

Mais recentemente Kanwar et al. (2015) utilizaram marcadores RAPD para verificar a fidelidade genética de 14 plantas de *Aloe vera* mantidas *in vitro* sendo subcultivadas a cada quatro semanas, durante seis meses, e encontraram 98% de similaridade entre a planta mãe e as micropropagadas.

Embora plantas regeneradas via organogênese direta sejam mais estáveis do que as regeneradas por calos (KAMENICKÀ; RYPÁK, 1989), não foi encontrado no presente trabalho diferença em nenhuma das vias de regeneração, uma vez que se obteve estabilidade genética em ambas as vias.

A ocorrência da variação somaclonal pode estar associada ao número e duração de subcultivos, uma vez que aumentando o número e a duração dos subcultivos aumentaria a taxa de variações somaclonais (BAIRU et al., 2011). Diante disso, poderia relacionar a inexistência de variação somaclonal encontrada, ao pequeno número de subcultivos que foi realizado. No entanto, Peng et al. (2015) através de análises citológicas e por marcadores ISSR e SRAP em calos de *Tetrastigma hemsleyanum* verificaram que após o quarto subcultivo já houve variação somaclonal, indicando subcultivar essa espécie por apenas 4 vezes para se obter plantas idênticas a planta mãe. O oposto foi observado no estudo de Hsie et al. (2015) com cana-de-açúcar que com 15 subcultivos realizados não encontraram variação somaclonal.

Portanto, uma explicação possível para a ausência de variação somaclonal verificada no presente trabalho pode ser a constituição genética dos indivíduos, uma vez que cada genótipo responde de forma diferente a variação que pode ser causada pelo estresse durante o cultivo *in vitro*, havendo alguns genótipos mais estáveis que outros devido a essas diferenças na composição genética (KARP, 1995; BAIRU et al., 2011).

Além disso, o tipo de explante utilizado na inoculação *in vitro* (GAO et al., 2010) e as condições do ambiente *in vitro* também podem ser determinantes para a ocorrência de variação somaclonal. O ambiente *in vitro* poderia estar relacionado com os tipos e concentrações de fitorreguladores (BAIRU et al., 2006), consistência e sistema de imersão do meio de cultura (FEUSER et al., 2003), número de subcultivos e idade da cultura *in vitro* (BAIRU et al., 2006; CURRAIS et al., 2013) e, finalmente, a rota regenerativa empregada (PHILLIPS et al., 1994). Nesse sentido, outro importante fator que pode ter contribuído para a ausência de variantes nas plantas regeneradas de mangabeira neste estudo foi o uso de baixas concentrações de fitorreguladores. De acordo com Bairu et al. (2011), reguladores de crescimento, especialmente em altas concentrações, podem induzir a ocorrência de variações somaclonais.

3.2 Análises de diversidade genética

Como não ocorreu variação somaclonal nas plântulas subcultivadas em comparação com suas plântulas matrizes, as análises de dissimilaridade foram realizadas somente entre as matrizes dos três locais.

A análise do padrão de bandas produzidas revelou a existência de polimorfismos entre as matrizes, para ambos os *primers*. Dos 15 *primers* ISSR selecionados 12 foram polimórficos (80%) e três foram monomórficos (20%), obtendo um total de 70 bandas amplificadas, sendo 21 polimórficas (Tabela 2). O *primer* UBC 848 obteve o maior número total de bandas e o maior número de bandas polimórficas (8 e 6, respectivamente).

A porcentagem de polimorfismo (Pol%) variou de 0, para os *primers* UBC 851, UBC 815 e UBC 866, até 75,0%, para o *primer* UBC 848, com média geral dos *primers* de 28,2%. Já o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), variou de 0, para os *primers* UBC 851, UBC 815 e UBC 866, até 0,281 para UBC 1, com média de 0,098. De acordo com Botstein et al. (1980), o valor do PIC varia de 0 para os perfis monomórficos até 1 para perfis altamente polimórficos, sendo que de acordo com sua classificação os marcadores com valores de PIC inferiores a 0,25 são considerados pouco informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos e superiores a 0,50 muito informativos. Diante disso os marcadores ISSR podem ser considerados pouco e mediamente informativos.

Valores semelhantes ao encontrado no presente trabalho foram obtidos por Akdemir et al. (2016), avaliando pistache (*Pistacia vera* L.) por meio de marcadores ISSR, obtiveram o total de 62 bandas, sendo 41 polimórficas, o valor máximo de polimorfismo foi de 77,8% e o PIC variou de 0,144 até 0,332. Martinez-Estrada et al. (2017), utilizaram 10 *primers* ISSR e obtiveram o total de 109 bandas e a maior porcentagem de polimorfismo foi de 57%. Mhatre et al. (2016), trabalhando com duas variedades de Painço (*Panicum milliaceum* L.) obteve PIC que variou de 0,14 até 0,88 para a cultivar Sakhroli e 0,39 até 0,89 para a cultivar Asond, relatando que os altos valores de PIC obtidos podem ser devido à alta diversidade entre as cultivares. Portanto, os baixos valores de PIC encontrado no presente trabalho podem ser explicados devido à baixa diversidade entre as matrizes de mangabeira utilizadas.

Tabela 2. Primers ISSR selecionados para avaliação da variação somaclonal nas plântulas de mangabeiras micropropagadas e para a análise da diversidade genética entre as plântulas matrizes

Primers ISSR	Sequência (5' – 3')	¹ TA (°C)	² NTB	³ NTBP	⁴ Pol (%)	⁵ PIC
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52,4	4	1	25,0	0,117
UBC 826	ACACACACACACACACC	52,4	3	1	33,3	0,060
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	52,4	5	2	40,0	0,100
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	52,4	3	1	33,3	0,165
UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50	3	1	33,3	0,060
UBC 1	ACACACACACACACACT	50	5	3	60,0	0,281
UBC 2	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50	4	1	25,0	0,124
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	50	7	1	14,3	0,063
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	50	5	2	40,0	0,158
UBC 851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	53,9	5	0	0,0	0,000
UBC 815	CTC TTC TCT CTC TCT CTG	53,9	5	0	0,0	0,000
UBC 848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	53,9	8	6	75,0	0,169
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	51,6	5	1	20,0	0,069
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	51,6	4	1	25,0	0,105
UBC 866	CTC CTCCTCCTCCTCCTC	60,7	4	0	0,0	0,000
Total		----	70	21	----	----
Média		----	4,66	1,4	28,2	0,098

¹Temperatura de anelamento; ²Número total de bandas; ³Número total de bandas polimórficas; ⁴Porcentagem de polimorfismo; ⁵Conteúdo de informação polimórfica.
Y= (C, T)

Para as análises utilizando os marcadores SSR, foram selecionados 16 *primers* que amplificaram o total de 32 alelos, com média de dois alelos por *primer* (Tabela 3).

Os *primers* com o maior número de alelos foram HS 01, HS 10, HS 14 e HS 33, com três alelos cada.

Tabela 3. Primers SSR selecionados para avaliação da variação somaclonal nas plântulas de mangabeiras micropropagadas e para a análise da diversidade genética entre as plântulas matrizes

Primers	Sequência (5' – 3')	¹ TA°C	² NA	³ PIC
HS 01	F: GTGTCTTCCATCCGAGCTTAAC R: TTTCCCAGAAAGGAGAGGTACA	50	3	0,593
HS 11	F: GTGATATTTTCGTGCTCTCCAAG R: CTCTGCCACTGTGCAACC	50	2	0,180
HS 18	F: ATTCATGCTCCACTGGCTTC R: GACCACAGCTAGTGACGTGTTTC	50	2	0,500
HS 17	F: ACTCGAGCAGAAGAAGCAAATC R: ACACACCCTCATCAGCCC	54	2	0,500
HS 27	F: TATAGTGGTCCTGCACCCTTGT R: TTTTCCCTTGTGCTTCGC	54	2	0,278
HS 08	F: AATGTAGAGGTGAACGAGTGGG R: TACACCCTGCTCATCGTTTATG	48	1	0,000
HS 16	F: CGTTGGTAGCGGCTGTATTAAG R: CCCCTCCTGCCACTCTCT	48	2	0,500
HS 10	F: ACAAATCAATGAGGAGGTGCTT R: TAACTATGTGCAACCGCAAGAC	52	3	0,583
HS 13	F: CTGGGGTACTTCAGCAAATCAC R: CATCAAAGACCGTTGTCTCCTT	56	1	0,000
HS 14	F: GAGCAGGAGTCAGGAAAATCAC R: ACAGTGAAGGGGCAATGAAG	56	3	0,525
HS 22	F: GGACGAAACGAAATGGAGAGTA R: AGTAAAGACACGTCATCCCCAC	56	1	0,000
HS 23	F: TGCAAACCCTCATTTCTTTTCTTC R: GGAGCAAATCGGGAAGCC	56	2	0,500
HS 30	F: GAGGAATCTCAGCCAAGTCCTA R: CCCAGCCTCTACAACTCTCTG	56	2	0,500
HS 33	F: CGTTGGTAGCGGCTGTATTAAG R: CACTCTCTTTTCCCGATTTTCC	56	3	0,665
HS 24	F: GCTAAATCAAGCAAACCTCGAC R: AAAGCAGTCCATGATCCATTTT	58	2	0,463
HS 26	F: CAAACAAGCTTTATGTGGGTCA R: AGCTCAAGGAAGTGGGATCTAA	58	1	0,000
	Total	----	32	----
	Média	----	2	0,361

¹Temperatura de anelamento; ²Número de alelos; ³Conteúdo de informação polimórfica

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0, para os *primers* HS 08, HS 13, HS 22 e HS 26, até 0,665, para o *primer* HS 33, com média de 0,361. Podendo ser considerados pouco e altamente informativos, segundo a classificação de Botstein et al. (1980). Valores similares foram relatados por Smiullah et al. (2012), que avaliando a variação somaclonal em cana-de-açúcar utilizando 15 *primers* SSR obtiveram o total de 31 alelos e o conteúdo de informação polimórfica variou de 0,110 até 0,404. Trabalhando com bananas derivadas de cultura de tecidos, Sales e Butardo (2014), obtiveram o valor máximo de conteúdo de informação polimórfica de 0,94. A diferença entre os valores encontrados no presente estudo em relação aos valores encontrados em outros trabalhos, pode ser devido a diversidade genética entre os indivíduos avaliados.

Para os *primers* ISSR, utilizou-se o complemento do Índice de Jaccard para se obter a matriz de dissimilaridade entre os indivíduos (plântulas matrizes). Observou-se que o valor mínimo de dissimilaridade encontrado foi entre Montes Claros1 e Montes Claros3 (0,016), e o valor máximo de dissimilaridade (0,174) foi entre Ouroana7 e Caçu9 (Tabela 4). A menor média de dissimilaridade individual foi obtida por Montes Claros1 e a maior por Ouroana7, com 0,069 e 0,105, respectivamente, e a média entre todas as matrizes foi de 0,089.

A matriz de dissimilaridade entre os indivíduos (plântulas matrizes), utilizando os dados dos *primers* SSR, foi obtida pelo complemento do Índice Ponderado. As menores dissimilaridades observadas foram entre Caçu1 e Caçu2, Ouroana7 e Ouroana8, com 0,000, e as maiores dissimilaridades ocorreram entre Caçu9 e Ouroana7, Caçu9 e Ouroana8, com 0,344 (Tabela 4). A menor média de dissimilaridade individual foi obtida por Caçu7 e a maior por Montes Claros3, com 0,127 e 0,215, respectivamente, e a média entre todas as matrizes foi de 0,174.

A correlação de Pearson entre as matrizes de dissimilaridade de ISSR e SSR foi de sentido positivo, magnitude mediana (0,510) e significativa a 1% de probabilidade pelo teste t, o que demonstra concordância entre as duas matrizes.

Os valores de dissimilaridade genética obtidos pelos diferentes marcadores moleculares demonstraram baixo valor de dissimilaridade, indicando que as plântulas matrizes são geneticamente próximas.

Tabela 4. Matriz de dissimilaridade genética entre os genótipos de mangabeira, acima da diagonal principal marcadores ISSR e abaixo SSR

	Montes Claros1	Montes Claros3	Caçu3	Caçu7	Caçu9	Caçu1	Caçu2	Ouroana7	Ouroana8	
Montes Claros1	0	0,016	0,095	0,125	0,127	0,095	0,068	0,065	0,033	
Montes Claros3	0,141	0	0,090	0,130	0,147	0,118	0,123	0,090	0,046	
Caçu3	0,188	0,281	0	0,075	0,091	0,118	0,109	0,145	0,104	
Caçu7	0,141	0,234	0,047	0	0,046	0,075	0,094	0,157	0,145	
Caçu9	0,172	0,250	0,172	0,125	0	0,062	0,081	0,174	0,162	
Caçu1	0,172	0,203	0,125	0,078	0,203	0	0,032	0,145	0,132	
Caçu2	0,172	0,203	0,125	0,078	0,203	0,000	0	0,123	0,109	
Ouroana7	0,219	0,313	0,266	0,219	0,344	0,250	0,250	0	0,046	
Ouroana8	0,219	0,313	0,266	0,219	0,344	0,250	0,250	0,000	0	
Média de ISSR	0,069	0,084	0,092	0,094	0,099	0,086	0,082	0,105	0,086	0,089
Média de SSR	0,158	0,215	0,163	0,127	0,201	0,142	0,142	0,207	0,207	0,174

De acordo com os resultados das análises do agrupamento UPGMA, a partir dos marcadores ISSR, foi construído um dendrograma com as plântulas matrizes de mangabeiras, com exceção de duas (Montes Claros2 e Ouroana1), as quais foram retiradas da análise devido a quantidade de dados perdidos que geraram. A partir do ponto de corte, as matrizes foram distribuídas em dois grupos (Figura 2). O grupo I é formado pelas matrizes de Montes Claros e Ouroana, sendo que as matrizes de Montes Claros ficaram mais próximas, já o grupo II formado pelas matrizes de Caçu.

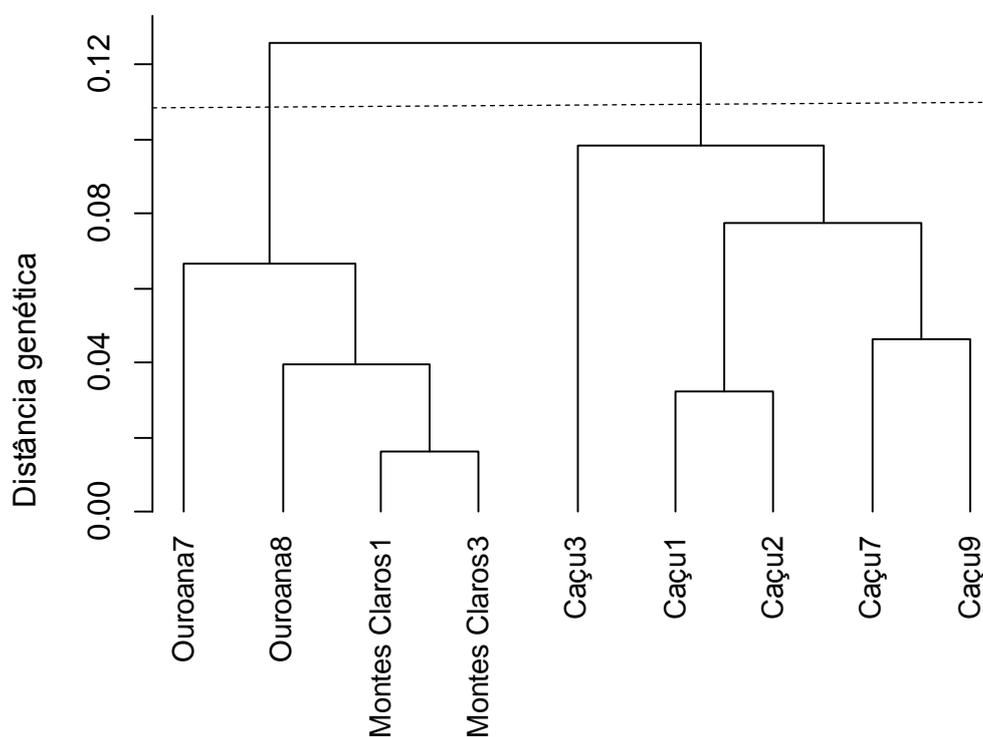


Figura 2. Dendrograma representando a distância genética entre as matrizes de mangabeiras dos três locais, para os *primers* ISSR, obtido pelo complemento do Índice de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA.

Para os marcadores SSR, o agrupamento UPGMA a partir do ponto de corte, distribuiu as matrizes em três grupos (Figura 3), sendo o grupo I formado pelas matrizes de Ouroana, o grupo II formado pelas matrizes de Montes Claros e o grupo III formado pelas matrizes de Caçu.

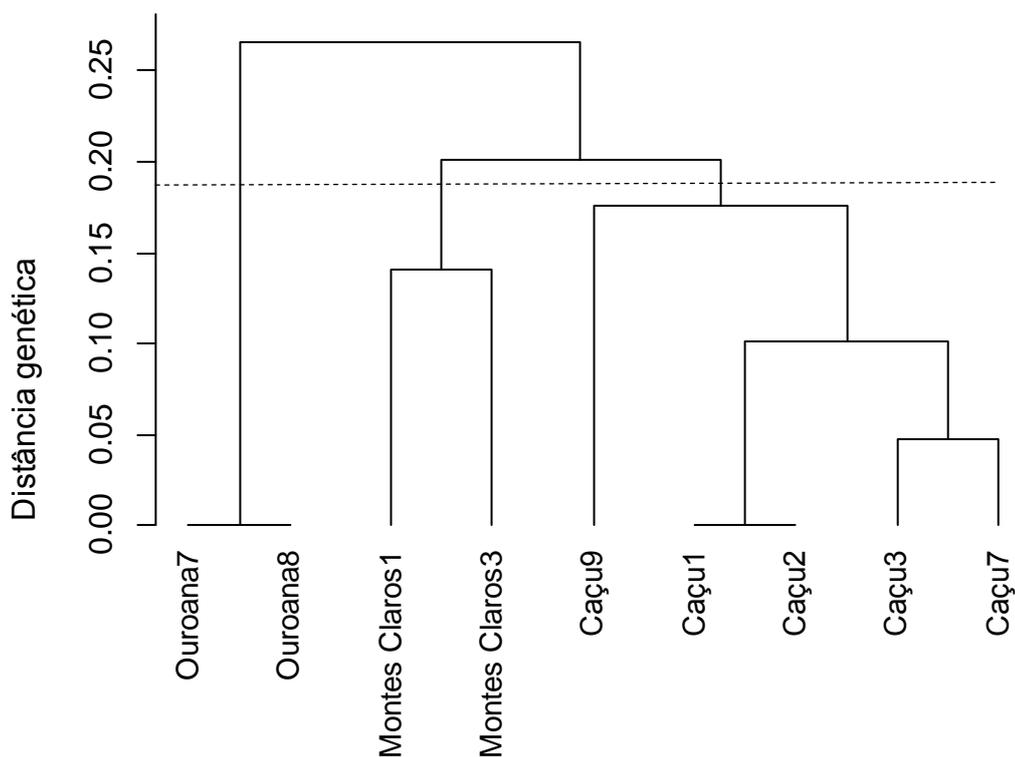


Figura 3. Dendrograma representando a distância genética entre as matrizes de mangabeiras dos três locais, para os *primers* SSR, obtido pelo complemento do Índice Ponderado e pelo agrupamento UPGMA.

Calculou-se o coeficiente de correlação cofenética (CCC), que é uma medida de concordância entre os valores originais de dissimilaridade e os representados pelo dendrograma (quanto maior o CCC menor será a distorção do agrupamento), sendo os valores de CCC acima de 0,8 indicativos de boa representatividade entre as distâncias (BUSSAB et al., 1990; CRUZ; CARNEIRO, 2006). O CCC obtido foi de 0,844 e 0,899 para ISSR e SSR, respectivamente, representando alto ajuste entre a matriz cofenética e a matriz de dissimilaridade, demonstrando alta confiabilidade do agrupamento.

Verifica-se que os marcadores moleculares ISSR e SSR foram capazes de agrupar as plântulas matrizes dos mesmos locais, demonstrando a eficiência desses marcadores em quantificar a variabilidade genética a nível molecular dos genótipos de mangabeira.

Diante dos resultados encontrados, nota-se a baixa dissimilaridade entre as plântulas matrizes utilizadas, principalmente as que pertenciam aos mesmos locais, uma vez que obtiveram os menores valores de dissimilaridade e se agruparam em um mesmo

grupo no dendrograma. Portanto as plântulas matrizes utilizadas nesse estudo são semelhantes geneticamente, ou seja, possuem baixa variabilidade genética, diante disso visando a conservação, o ideal seria selecionar outros indivíduos que tivessem maior variabilidade genética para serem conservados e multiplicados e assim poder conservar mais variabilidade genética.

4. CONCLUSÃO

As vias de organogênese direta e indireta utilizadas no presente estudo durante a micropropagação de mangabeiras não influenciaram na ocorrência de variação somaclonal, indicando que essa ocorrência está relacionada ao próprio genótipo ou às baixas concentrações de fitorreguladores que foram utilizadas. A inexistência de variação somaclonal encontrada mostra que a micropropagação de mangabeiras nas seguintes condições aqui abordadas pode ser realizada com sucesso, mantendo a fidelidade genética da planta matriz nas progênies até o sexto subcultivo.

Além disso, foi possível verificar, que plântulas matrizes utilizadas nesse estudo são semelhantes geneticamente, indicando variabilidade genética relativamente baixa. Assim, para se utilizar as técnicas de micropropagação visando a conservação da espécie, sugere-se selecionar outros indivíduos que apresentem maior variabilidade genética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDEMIR, H.; SUZERER, V.; TILKAT, E.; ONAY, A.; ÇİFTÇİ, Y. O. Detection of Variation in Long-Term Micropropagated Mature Pistachio via DNA-Based Molecular Markers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 180, p. 1301-1312, 2016.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, 63, p. 47-173, 2011.

BAIRU, M. W.; FENNELL, C. W.; VAN, S. J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). **Scientia Horticulturae**, 108, p. 347-351, 2006.

BASTOS, L. T.; MOREIRA-SOUZA, M. J.; COSTA, A. P. C.; ROCHA, M. C.; HANSEN, D. S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. S. Cultivo in vitro de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007.

BATHIA, R.; SINGH, K. P.; JHANG, T.; SHARMA, T. R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, 119, p. 208-211, 2009.

BENNICI, A.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G. G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 166, p. 221-227, 2004.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2ª ed. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009.

BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R. S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, n. 3, p. 231-233, 1998.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BUSSAB, W. O.; MIAZAK, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 1990.

COSTA, D. F.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancorniaspeciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2. ed. Viçosa: UFV, v. 2, p. 585, 2006.

CURRAIS, L.; LOUREIRO, J.; SANTOS, C.; CANHOTO, J. M. Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 114, n. 2, p. 149-159, 2013.

DARRAULT, R. O.; SCHLINDWEIN, C. Polinização de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, Aracaju, SE. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003.

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

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by

isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 72, p. 221-227, 2003.

GAO, X.; YANG, D.; CAO, D.; AO, M.; SUI, X.; WANG, Q. M.; KIMATU, J. N.; WANG, L. In vitro micropropagation of Freesia hybrid and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. **Journal of Plant Growth Regulation**, 29, p. 257-267, 2010.

HISIE, B. S.; BRITO, J. Z.; VILA-NOVA, M. X.; BOREGES-PALUCH, L. R.; SILVA, M. V.; DONATO, V. M. S. T. Determining the genetic stability of micropropagated sugarcane using inter-simple sequence repeat markers. **Genetics and molecular research**, 14, p. 17651-17659, 2015.

HUANG, W. J.; NING, G. G.; LIU, G. F.; BAO, M. Z. Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 159-163, 2009.

JAIN, R.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, J.; GUPTA, P. S. Assessment of genetic purity of micropropagated plants of sugarcane by isozyme and RAPD analysis. **Sugar Tech**, 7, p. 15-19, 2005.

JIMENES, H. J.; MARTINS, A. V. V.; MONTARROYOS, J. F. et al. Genetic diversity of the Neotropical tree *Hancornia speciosa* Gomes in natural populations in Northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 17749-17757, 2015.

KAMENICKÀ, A.; RYPÁK, M. The regeneration of *Actinidia chinensis* Pl. cultured in vitro. **Polnohospodarvo**, 35, p. 811-818, 1989.

KANWAR, K.; DEVI, V.; SHARMA, S.; SONI, M.; SHARMA, D. Effect of physiological age and growth regulators on micropropagation of *Aloe vera* followed by genetic stability assessment. **National Academy Science Letters**, 38, p. 29-35, 2015.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, 85, p. 295-302, 1995.

KRISHNA, H.; ALIZADEH, M.; SINGH, D.; SINGH, U.; CHAUHAN, N.; EFETEKHARI, M.; SADH, R. K. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, v. 6, n. 54, p. 1-18, 2016.

LAL, M.; TIWARI, A. K.; GUPTA.; G. N. Commercial scale micropropagation of sugarcane: constraints and remedies. **Sugar Tech**, 17, p. 339-347, 2015.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, 60, p. 197-214, 1981.

MAECHLER, M. Cluster analysis extended Rousseeuw. 2010. Disponível em [<http://brieger.esalq.usp.br/CRAN/>]. Acessado em março de 2018.

MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; AVIANO, C. S. FERNANES, P. D. The latex obtained from *Hancorniaspeciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 135, p. 530-537, 2011.

MARTINEZ-ESTRADA, E.; CAAMAL-VELÁZQUEZ, J. H.; SALINAS-RUÍZ, J.; BELLO-BELLO, J. J. Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 53, p. 553-560, 2017.

MHATRE, S. G.; SAWARDEKAR, S.V.; PATIL, D. M.; GOKHALE, N. B. Analysis of Callus Generated Somaclonal Variation in Proso Millet (*Panicummilliaceum* L.). Through Molecular Markers. **Journal of the Indian Society of Coastal Agricultural Research**, v. 34, n. 1, p. 81-87, 2016.

MOURA, N. F, CHAVES L. J, VENKOVSKY R, NAVES R. V.; AGUIAR, A. V.; MOURA, M. F. Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations

in the cerrado region of central Brazil. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 3, p. 473-481, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p 473-479, 1962.

NWAUZOMA, A. B.; JAJA, E. T. A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp): mechanisms and applications. **Journal of Applied Biosciences**, 67, p. 5252-5260, 2013.

PENG, X.; ZHANG, T. T.; ZHANG, J. Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 122, p. 67-77, 2015.

PEREIRA, A. C.; PEREIRA, A. B.; MOREIRA, C. C.; BOTION, L. M.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **Journal of Ethnopharmacology**, 161, p. 30-35, 2015.

PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91, p. 5222-5226, 1994.

RATHORE, M. S.; SHAIK, P. Y.; MASTAN, S. G.; PRAKASH.; C. R.; SINGH, A.; AGARWAL, P. K. Evaluation of genetic homogeneity in tissue culture regenerates of *Jatropha curcas* L. using flow cytometer and DNA-based molecular markers. **Applied biochemistry and biotechnology**, 172, p. 298-310, 2014.

RODRIGUES, A. J.; YAMAGUISHI, A. T.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S.; LIMA, J. S.; TELLES, M. P. Development of microsatellite markers for *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **Genetics and molecular research**, v.14, n.3, p. 7274-7278, 2015.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Revista Ciência Rural**, v. 41, n.1, p.57- 62, 2011.

SAHA, S.; ADHIKARI, S.; DEY, T.; GHOSH, P. RAPD and ISSR based evaluation of micropropagated plantlets of *Morus alba* l. variety S- 1. **Meta Gene**, v. 7, p. 7-15, 2016.

SALES, E. K.; BUTARDO, N. G. Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 8, n. 6, 2014.

SCHELLENBAUM, P.; MOHLER, V.; WENZEL, G.; WALTER, B. Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitisvinifera*L.). **BMC Plant Biology**, v.8, p.78, 2008.

SILVA JÚNIOR, J. F da; LEDÓ, A. S. **A cultura da mangaba**. Aracajú: EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, 84 p, 2015.

SMIULLAH.; KHAN, F. A.; ABDULLAH.; AFZAL, A.; JAVED, M. A.; IQBAL, Z.; IFTIKHAR, R.; WATOO, J. I. In vitro regeneration, detection of somaclonal variation and screening for mosaic virus in sugarcane (*Saccharum* spp.) somaclones. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 48, p. 10841-10850, 2012.

SOARES, D. M.; SATTTLER, M. C.; FERREIRA, M. F.; PRAÇA-FONTES.; M. M. Assessment of genetic stability in three generations of in vitro propagated *Jatropha curcas* L. plantlets using ISSR markers. **Tropical Plant Biol**, v. 9, n. 230, p. 229-238, 2016(a).

SOARES, A. N. R.; VITÓRIA, M. F.; NASCIMENTO, A. L. S.; LEDO, A. S.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016(b).

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA. A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p. 1048-1053, 2007.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de; SILVA, D. R. G.; PAIVA, P. D. de O. Cultura da mangabeira. **Boletim Agropecuário**, n.67, p.1-12, 2005.

THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, 37, p.169-180, 2007.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, v. 7, p. 53-65, 1943.

XAVIER, A.; OTONI, W. C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.