

# Diversidade Genética entre Cultivares de Aceroleiras Estimada por Meio de Marcadores do Tipo ISSR

*Simone Sales Souza<sup>1</sup>; Pedro Henrique Dias Nascimento<sup>2</sup>; Flávio de França Souza<sup>3</sup>; Natoniel Franklin de Melo<sup>4</sup>*

## Resumo

A aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé e Mociño ex DC.) é uma planta originária da América Central e região norte da América do Sul. O Brasil é o maior produtor mundial de acerola. Seus frutos possuem um alto valor comercial e se destacam como fonte nutricional, pois possuem um alto teor de ácido ascórbico. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a diversidade genética em seis cultivares de aceroleira por meio de marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). As amostras de folhas foram coletadas no BAG de aceroleira da Embrapa Semiárido, localizado no Campo Experimental de Bebedouro, em Petrolina, PE, e levadas para o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido para a extração de DNA genômico e análise do polimorfismo de bandas produzidas por iniciadores ISSR. Os 27 iniciadores ISSR selecionados amplificaram 800 bandas com tamanhos variando entre 250-2500 pb (média de 29,62 bandas). Desse total, 25 iniciadores mostraram polimorfismos entre as cultivares, gerando 302 bandas polimórficas (média de 11,18 bandas), representando um polimorfismo médio de 37,75%. Os marcadores ISSR permitiram estimar a diversidade genética, gerando informações úteis para uso no programa de melhoramento genético.

**Palavra chave:** *Malpighia emarginata*, genótipos, polimorfismo, melhoramento genético.

<sup>1</sup>Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), bolsista PIBIC - CNPq/Embrapa, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Mestrando em Agronomia – Produção Vegetal, Universidade Federal do Vale do São Francisco(Univasf), Petrolina, PE.

<sup>3</sup>Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, flavio.franca@embrapa.br.

<sup>4</sup>Biólogo, D.Sc. em Biologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, natoniel.melo@embrapa.br.

## Introdução

A aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé e Mociño ex DC. – Malpighiaceae) é uma planta originária da América Central e da região norte da América do Sul. É uma importante frutífera tropical que se caracteriza pelo crescimento rápido e por produzir frutos que se destacam pelo elevado teor de vitamina C (MACIEL et al., 2008). Do ponto de vista econômico, sua importância se dá pela comercialização de frutos in natura, produção de sucos, geleias, sorvetes, extração de ácido ascórbico para a indústria farmacêutica e a elaboração de muitos outros subprodutos que se destinam ao mercado interno e externo (LIMA et al., 2003).

De acordo com Souza et al. (2013), há uma demanda crescente pela fruta tanto no mercado interno como no externo, sendo necessário o aumento das áreas de cultivo. Desse modo, a demanda por novos genótipos tem aumentado e algumas cultivares têm sido indicadas para o plantio em regiões como aquelas localizadas no Vale do São Francisco, nos estados da Bahia, Minas Gerais, Pernambuco e Sergipe. Entretanto, o cultivo dessa espécie encontra-se ameaçado por alguns fatores, como a suscetibilidade dos clones comerciais a nematoses (*Meloidogyne* spp.), a oferta restrita de cultivares com alto desempenho agrônômico e portadoras de características sensoriais e nutracêuticas, e a vulnerabilidade dos pomares, por causa da sua uniformidade genética.

A existência de germoplasma com variabilidade genética é requisito básico para o estabelecimento de programas de melhoramento. Nesse sentido, foi criado um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de aceroleira na Embrapa Semiárido, buscando-se reunir os principais materiais de aceroleira existentes no Brasil, com o objetivo de conservar e gerar novos materiais.

Para a caracterização dos acessos de BAGs, uma das estratégias mais usadas é a utilização de análises com uso de marcadores moleculares do tipo ISSR (Inter Simple Sequence Repeat; Sequências Simples Repetitivas Internas) porque esses marcadores permitem uma rápida distinção entre indivíduos aparentados, por causa do elevado grau de polimorfismo e reprodutibilidade, permitindo a identificação de variabilidades tanto intra como interespecíficas (NG; TAN, 2015).

Dessa forma, este trabalho objetivou contribuir com a caracterização do BAG de aceroleira da Embrapa Semiárido, mediante o emprego de marcadores moleculares ISSR, buscando-se estimar a diversidade genética entre seis cultivares de aceroleiras, gerando informações para seu uso em programa de melhoramento genético.

## Material e Métodos

Foram avaliadas seis cultivares de aceroleira (Flor Branca, Okinawa, Sertaneja, Costa Rica, Cabocla e Rubra) provenientes do BAG de aceroleira da Embrapa Semiárido, localizado no Campo Experimental de Bebedouro, em Petrolina, PE. As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido.

Para a extração do DNA, utilizou-se o procedimento descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação do DNA foi estimada em gel de agarose a 1% (p/v) mediante comparação com DNA de fago  $\lambda$  (5, 10 e 20 ng), corado com brometo de etídio. As amostras foram diluídas para 10 ng/ $\mu$ L e armazenadas a -20 °C.

As reações de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas em termociclador Gene Amp 9600, onde cada reação foi aferida para um volume final de 25  $\mu$ L, composta de uma mistura com concentração final de 3 mM de  $MgCl_2$ , 0,2  $\mu$ M de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,5  $\mu$ M do iniciador ISSR, 1x tampão de reação de PCR, 0,7 unidade de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água ultrapura. Foi realizado um teste preliminar com 100 iniciadores ISSR em uma das cultivares, sendo escolhidos 27 iniciadores para aplicação nos demais genótipos em função da sua nitidez, quantidade e polimorfismos das bandas geradas.

As amplificações foram conduzidas com os seguintes ciclos: 95 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 45 segundos, 72 °C por 75 segundos. Para finalizar, foi realizada uma extensão a 72 °C por 5 minutos, deixando os produtos das reações a 4 °C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 2% (p/v) submetidos à voltagem constante de 100 V por 3 horas e corados com brometo de etídio. A visualização dos amplicons foi realizada sob

luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 1 kb (Norgen). Os marcadores ISSR foram convertidos em dados binários, onde se atribui valor um para presença e valor zero para ausência de bandas.

## Resultados e Discussão

Os 27 iniciadores ISSR amplificaram 800 bandas com tamanhos variando entre 250-2.500 pb (média de 29,62 bandas). Desse total, 25 iniciadores mostraram polimorfismos entre as cultivares, gerando 302 bandas polimórficas (média de 11,18 bandas), representando um polimorfismo médio de 37,75% (Tabela 1). O número de fragmentos obtidos variou de 2 a 66 bandas para os iniciadores TriCAC5'CY e DiCA5'CY, respectivamente. Foram observadas 100% de bandas polimórficas para os iniciadores DiGT5'CY, TriCAG, TriACT3'RC, TriTCG3'RC, TriAGT3'RC, TriGTA3'RC, TriGCA3'RC, DiCA e DiCA3'YG. Por sua vez, os iniciadores TriGTG3'RC e TriCAC5'CY geraram apenas 3,22% e 5,26% de fragmentos polimórficos.

Os marcadores ISSR utilizados revelaram a existência de variabilidade genética entre as cultivares, sendo a Flor Branca a que apresentou o maior número de bandas com número médio de 6,25 bandas por iniciador (Tabela1).

Lima et al. (2015) avaliaram a diversidade genética entre acessos de clones provenientes principalmente de um jardim de sementes de aceroleira, obtendo 79,57% de fragmentos polimórficos, com valor médio de 9,3 marcadores por iniciador ISSR. Neste trabalho, apesar do menor polimorfismo de bandas obtido (37,75%) entre as cultivares analisadas, observou-se um valor médio de 11,18 marcadores por iniciador ISSR. A diferença de variabilidade detectada pode estar correlacionada com a origem (se a partir de sementes ou de estacas) dos genótipos de aceroleira avaliados. Nesse caso, mesmo considerando-se que a aceroleira tem uma base genética estreita, pode ocorrer aumento da variabilidade genética durante o processo de meiose, cuja fixação ocorre em plantas formadas a partir de sementes, quando utilizadas na produção de mudas.

**Tabela 1.** Iniciadores ISSR utilizados na amplificação dos genótipos de *Malpighia emarginata* com suas respectivas sequências, número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), percentagem de polimorfismo (P%), número de bandas por genótipo (NBG) e amplitude de fragmentos (AF).

Primer	Sequência*	NTB	NTP	P(%)	NBG						AF (pb)
					Cabocla	Costa Rica	Sertaneja	Flor Branca	Rubra	Okinawa	
1-DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	14	8	57,14	3	3	2	1	2	3	250 – 1000
2-DiGT5'CR	CRGTGTGTGTGTGTGTGT	24	12	50,0	4	3	3	6	4	4	400 – 1250
3-DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT	7	7	100,0	0	0	0	7	0	0	500 – 1500
4-TriCAG3'YC	CACCACCACCACCACYC	12	6	50,0	1	1	1	7	1	1	450 – 1600
5-TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC	13	7	53,84	1	1	2	6	1	2	450 – 1400
6-TriCAC5'CY	CYCACCACCACCACCAC	38	2	5,26	7	7	6	6	6	6	350 – 1600
7-TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG	20	20	100,0	4	4	4	0	4	4	500 – 1400
8-TriCAG3'RC	CAGCAGCAGCAGCAGRC	52	40	76,92	10	10	10	2	10	10	300 – 1400
9-TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC	64	10	15,62	11	9	11	11	11	11	300 – 2000
10-TriGTG3'RC	GTGGTGGTGGTGGTGRC	62	2	3,22	10	10	11	11	10	10	350 – 2000
11-TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT	32	14	43,75	5	5	3	7	6	6	300 – 2000
12-TriAAC3'RC	AACAACAACAACAACRC	53	41	77,35	11	3	9	8	11	11	300 – 2000
13-TriACA3'RC	ACAACAACAACAACARC	43	13	30,23	6	8	10	5	7	7	250 – 1500
14-TriACT3'RC	ACTACTACTACTACTRC	6	6	100,0	0	0	0	6	0	0	500 – 1500
15-TriACG3'RC	ACGACGACGACGACGRC	48	0	0	8	8	8	8	8	8	300 – 2000

Continua ...

Continuação.

Primer	Sequência*	NTB	NTP	P(%)	NBG						AF (pb)
					Cabocla	Costa Rica	Sertaneja	Flor Branca	Rubra	Okinawa	
16-TriTCG3'RC	TCGTCGTCGTCGTCGRC	20	20	100,0	4	4	4	0	4	4	700 – 2000
17-DiGA5'CR	CRGAGAGAGAGAGA-GAGA	51	15	29,41	8	7	8	10	10	8	300 – 2000
18-TriAGT3'RC	AGTAGTAGTAGTAGTRC	2	2	100,0	0	0	0	2	0	0	1000 – 1250
19-TriGTA3'RC	GTAGTAGTAGTAGTARC	7	7	100,0	0	0	0	7	0	0	300 – 1250
20-TriGCA3'RC	GCAGCAGCAGCAGCARC	9	9	100,0	0	0	0	9	0	0	300 – 2000
21-DiCA	CACACACACACACACA	6	6	100,0	0	0	0	6	0	0	300 – 1600
22-DiCA3'RG	CACACACACACACACARG	27	9	33,33	5	4	5	5	4	4	250 – 1750
23-DiCA3'YG	CACACACACACACACAYG	8	8	100,0	4	0	0	4	0	0	400 – 900
24-DiCA5'CY	CYCACACACACACACACA	66	0	0	11	11	11	11	11	11	350 – 2500
25-DiCA5'G	GCACACACACACACACA	50	8	16	9	9	8	8	8	8	350 – 2500
26-DiGA3T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	54	24	44,44	10	9	10	10	5	10	300 – 2500
27-DiGA3'YC	GAGAGAGAGAGAGA-GAYC	12	6	50,0	1	2	1	6	1	1	350 – 1000
Total		800	302	37,75	133	118	127	169	124	129	
P(%)		-	-	-	16,6	14,8	15,9	21,1	15,5	16,1	
Média		29,62	11,18	-	4,92	4,37	4,7	6,25	4,59	4,77	

\*R = A+G; Y = C+T

## Conclusão

Os marcadores ISSR foram eficientes para estimar a diversidade genética entre os genótipos de *Malpighia emarginata* do BAG de aceroleira da Embrapa Semiárido, gerando informações sobre o polimorfismo entre as cultivares e possibilitando o seu uso para o programa de melhoramento genético.

## Referências

- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [Rockville], v. 12, p.13-15, 1990.
- LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, D. E. S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 101-103, 2003.
- LIMA, E. V.; ARAÚJO, M. E. B.; BERTINI, C. H. C. M.; MOURA, C. F. H.; HAWERROTH, M. C. Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 6, n. 2, p. 174-180, 2015.
- MACIEL, M. I. S.; SILVA, W. S. da; SOUZA, K. A. de; MELO, E. de. A.; LIMA, V. L. A. G. de; PEDROSA, E. M. R. Modificações pós-colheita em frutos de 16 genótipos de aceroleira armazenados sob refrigeração. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 3, p. 157-163, 2008.
- NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? **ASM Science Journal**, Kuala Lumpur, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.
- SOUZA, F. F.; DEON, M. D.; CASTRO, J. M. da C.; LIMA, M. A. C.; RYBKA, A. C. P.; FREITAS, S. T. de. **Principais variedades de aceroleiras cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. (Embrapa Semiárido. Documentos, 255). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/99018/1/SDC255.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2016.