

# VARIABILIDADE GENÉTICA DE GRAVIOLEIRA IDENTIFICADA POR MARCADORES ISSR

Eveline Nogueira Lima<sup>1</sup>, José Jaime Vasconcelos Cavalcanti<sup>2</sup>, Frederico Inácio Costa de Oliveira<sup>3</sup>, Jose Emilson Cardoso<sup>4</sup> e Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini<sup>5</sup>.

## Resumo

Fruteiras tropicais, como a graviola (*Anonas muricata* L.) são alternativas sociais e econômicas de alto potencial, uma vez que se trata de fruta adaptada à região Nordeste e muito apreciada pelos mercados interno e externo. No entanto, o número de cultivares e a exploração da variabilidade genética existente ainda são incipientes. Objetivou-se neste trabalho avaliar a variabilidade genética de 25 progênies de gravioleira utilizando marcadores moleculares ISSR. Amostras de folhas foram coletadas em Paraipaba-CE e levadas ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE. Foram utilizados cinco iniciadores, que promoveram a formação de 27 bandas polimórficas, as quais possibilitaram diferenciações entre as plantas em estudo. Estes resultados indicam que há presença de variabilidade genética entre os genótipos de gravioleira.

## Introdução

As fruteiras tropicais nativas ou introduzidas, como a graviola (*A. muricata* L.) são alternativas de alto potencial para exploração comercial, uma vez que se trata de uma fruta ecologicamente adaptada à região Nordeste, além de apreciada pelos mercados interno e externo.

A importância sócio-econômica da graviola no Brasil tem aumentado nos últimos anos principalmente pela demanda para o consumo de frutas tropicais com grande apelo natural, pelas características nutricionais. Este potencial econômico tem ensejado um crescente interesse por parte de produtores, técnicos, agentes de desenvolvimento e agroindústrias de processamento no Nordeste brasileiro. Infelizmente, a grande maioria dos projetos de exploração extensiva dessa anonácea no Nordeste revelou-se frustrante quanto ao desempenho vegetativo e produtivo, evidenciando a falta de informações científicas e tecnológicas para essa cultura, principalmente no controle de agentes patogênicos. Com isso, inúmeros insucessos foram verificados ao longo dos anos decorrentes do declínio precoce de extensos pomares.

Estudos sobre a variabilidade genética da espécie são relevantes, pois restrições no fluxo gênico entre populações têm papel importante na evolução da adaptação local, o que inclui desenvolvimento de resistência a inseticidas e estabelecimento de raças hospedeiras (GONZÁLEZ- RODRÍGUEZ et al., 2002). Visando um efetivo controle de pragas e doenças para essa cultura, fez-se necessário o entendimento sobre a variação genética dentro e entre populações dessa frutífera.

Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho, avaliar a variabilidade genética de 25 progênies de gravioleira utilizando marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).

## Material e métodos

Foram utilizadas 25 progênies de graviola plantadas em maio/2003 e selecionadas por meio da seleção fenotípica de plantas superiores em plantios de propagação sexuada, em pomares domésticos e em cultivos comerciais no Ceará e Piauí.

Amostras de folhas foram coletadas no município de Paraipaba no estado do Ceará e levadas ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE. Foi realizada a extração de DNA segundo protocolo de Cavalcanti (2004), com algumas modificações.

---

1 Aluna de graduação, Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, E-mail: evelinenlima@gmail.com  
2. Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical em Biologia molecular, Fortaleza, CE, E-mail: jaime@cnpat.embrapa.br  
3. Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical em Melhoramento de plantas, Fortaleza, CE, E-mail: emilson@cnpat.embrapa.br  
4. Aluno de graduação, Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, E-mail: fred.inacio@hotmail.com  
5. Professora titular do departamento de fitotecnia na Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, E-mail: candida\_bertini@yahoo.com.br

Após a extração, os DNAs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em cada poço foram colocados 4 µL de DNA e 2 µL de tampão de carregamento. Foram realizadas reações de PCR com 11 iniciadores da marca IDT (Integrated DNA Technologies), dos quais cinco forneceram fragmentos polimórficos. As análises de reações de amplificação foram realizadas utilizando esses cinco iniciadores ISSR. As reações de ISSR foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo: 1X PCR Buffer, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µM do iniciador; 10 ng de DNA, 20 µg de BSA e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase. As amplificações foram feitas em um termociclador TECHNE TC-512, programado da seguinte forma: 94 °C por 5 min (Desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos com: 94 °C por 1 min; temperatura de anelamento (Variável para cada iniciador) por 1 min e 72 °C por 1 min, concluindo-se com 72 °C por 5 min (Extensão final).

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,8%, corados com brometo de etídio, no primeiro poço foi colocado o marcador de 1KB (10 µL) e nos demais poços foram colocados 10 µL da PCR mais 5 µL de tampão de carregamento. Após três horas de eletroforese as bandas foram visualizadas em transiluminador UV.

Os produtos amplificados foram analisados quanto à presença ou ausência de bandas. Para a análise da divergência genética entre os genótipos utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard e para o agrupamento dos genótipos utilizou-se o do vizinho mais próximo. Todas as análises foram realizadas pelo programa computacional Genes (CRUZ, 2001). O polimorfismo dos marcadores ISSR foi estimado calculando-se a percentagem de fragmentos polimórficos pelo número total de fragmentos amplificados.

## Resultados e Discussão

Os cinco iniciadores utilizados geraram um total de 27 bandas polimórficas de um total de 47 (Tabela 1). O número de marcadores polimórficos por iniciador variou de três (iniciadores I 812) a onze (iniciador I 826). Na Figura 1 encontra-se o padrão obtido a partir do iniciador de código I 812. A média de similaridade encontrada entre os genótipos avaliados foi de 32% (Figura 2). O padrão de amplificação encontrado apresentou um grande número de bandas, sendo esta uma característica dos marcadores ISSR.

O dendrograma gerado pelo programa apresentou seis grupos distintos (Fig. 2). No primeiro grupo, o indivíduo 5 aparece isolado e com similaridade mínima em relação aos outros grupos. O segundo grupo também é formado por um único indivíduo (24) e mantém com os grupos 3, 4, 5 e 6 uma dissimilaridade média de 70%. Em geral, o índice de similaridade encontrado entre os grupos foi de aproximadamente 35%. Freitas et al. (2000) cita que para espécies cultivadas, como o trigo, o índice de similaridade média equivale a 73%, sendo visível assim a intrínseca relação entre domesticação e similaridade genética.

A utilização de genitores tão divergentes e que apresentam alelos de interesse, como resistência às principais doenças e estabilidade de produção, pode ser uma opção vantajosa em cruzamentos futuros, onde se pode investigar e explorar o fenômeno da heterose.

Os Marcadores ISSR, devido seu alto mecanismo de reconhecimento de variações inter e intraespecíficas, tem sido bastante utilizados em trabalhos de melhoramento de plantas. A divergência genética entre genitores pode promover combinações gênicas favoráveis, mediante efeitos de aditividade, pleiotropia e epistasia (CHIORATO, A. F. 2004).

O fato de a gravioleira ser uma frutífera ainda em domesticação justifica a baixa similaridade encontrada entre os genótipos. Esta divergência tão acentuada é interessante em trabalhos de melhoramento de plantas de crescimento indeterminado, pois permite a permuta de caracteres genéticos distintos e sua aplicação pode estender-se por vários anos, ao contrário de culturas anuais e bianuais.

## Conclusões

- Há presença de variabilidade genética entre os genótipos de gravioleira estudados.
- Marcadores moleculares ISSR são eficientes para analisar a divergência genética entre as progênes dos representantes de Anonaceae, auxiliando em trabalhos de melhoramento das mesmas.

## Referências

CAVALCANTI, J. J. V. Genetic mapping and QTL identification in cashew (*Anacardium occidentale* L.). Inglaterra, 2004. *Tese (Doutorado)* - University of Reading.

CHIORATO, A. F. Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do Banco de Germoplasma do Instituto Agrônômico IAC. 2004. 85f. *Dissertação (Mestrado em Melhoramento Vegetal)* Pós Graduação IAC.

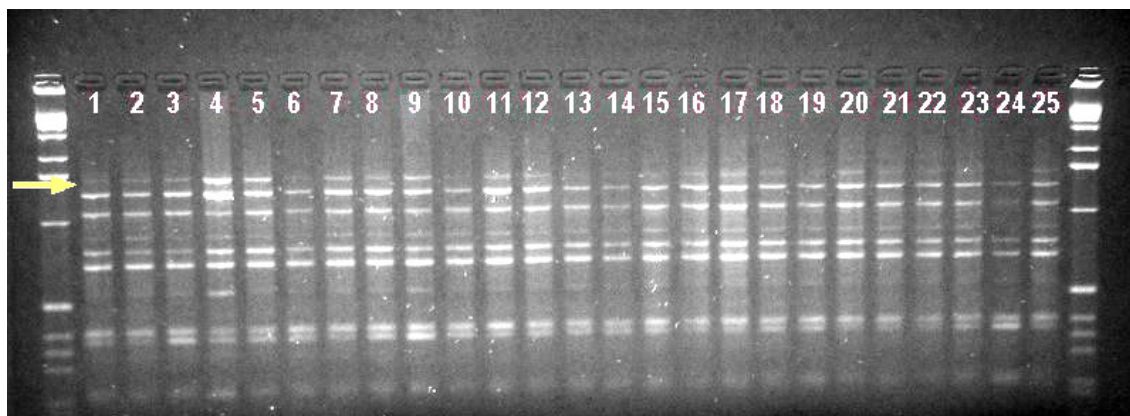
FREITAS, L.B.; JERUSALINSKY, L.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M. Extreme homogeneity among Brazilian Wheat genotypes determined by RAPD markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 11, p. 2255-2260. 2000.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; BENREY, B.; CALLEJAS, A.; OYAMA, K. Inter and intraspecific genetic variation and differentiation in the sibling bean weevils *Zabrotes subfasciatus* and *Z. sylvestris* (Coleoptera: Bruchidae) from Mexico. *Bulletin of Entomological Research*, v.92, p.185-189, 2002.

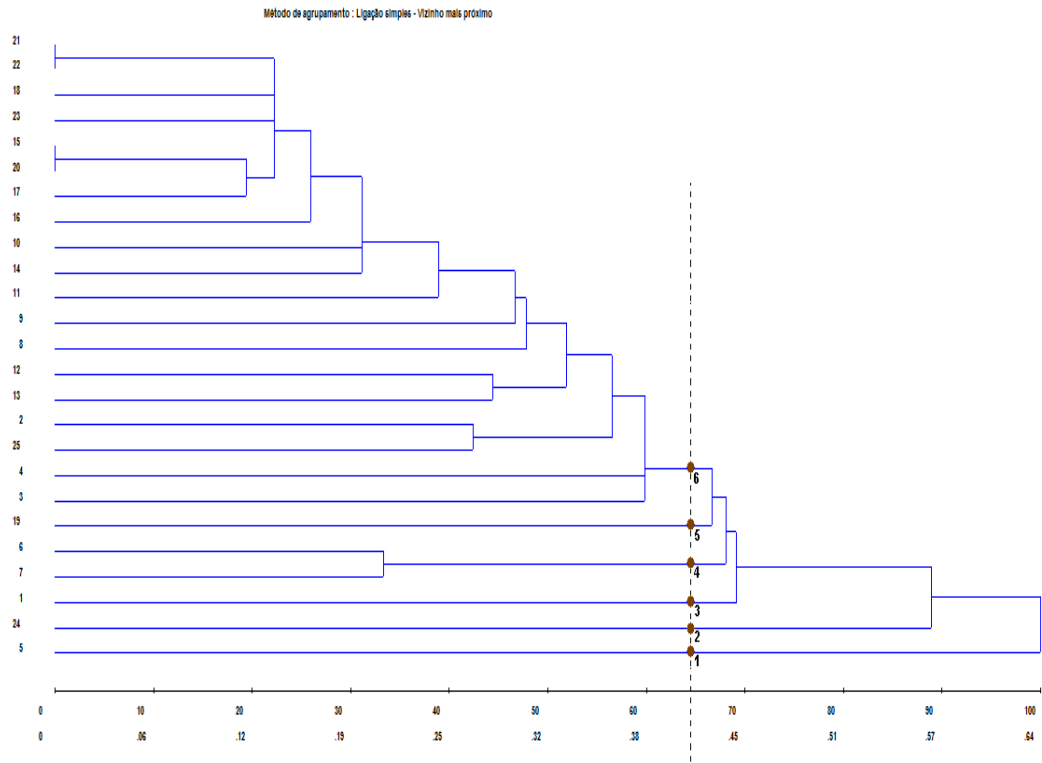
SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.43, n.7, p.843-849, jul. 2008.

**Tabela 1.** Variação genética detectada entre 25 progênies de gravioleira por meio de cinco marcadores ISSR.

Código do Iniciador	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)	Nº total de Bandas	Nº de Bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
I 886	VDV CTC TCT CTC TCT CT	47,4	10	5	50,0
I 851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	52,0	8	4	50,0
I 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	44,7	9	3	33,3
I 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	50,4	7	4	57,1
I 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	51,8	13	11	84,6
TOTAL			47	27	57,4



**Figura 1.** Padrão de amplificação de treze genótipos de cajazeira utilizando o iniciador I 812. Linhas laterais marcador de 1Kb e linhas de 1 a 25 correspondem aos genótipos de gravioleira. Seta indica marcador polimórfico.



**Figura 2.** Dendrograma de dissimilaridade genética de 25 genótipos de Gravioleira, baseado no índice de Jaccard, estimado a partir de 27 marcadores ISSR.