

Caracterização Citogenética e Molecular de Acessos de Aceroleira Objetivando a seleção de Genótipos mais Promissores para o Vale do São Francisco

Cytogenetic and Molecular Characterization of Acerola Accessions in Order to Select the most Promising Genotypes for the São Francisco Valley

Pedro Henrique Dias Nascimento¹; Simone Sales Souza²; Flávio de França Souza³; Nataniel Franklin de Melo⁴

Abstract

The acerola fruit has high commercial value that stands out as a nutritional source, because it has a high content of ascorbic acid. The present study aimed to evaluate the genetic diversity in four acerola cultivars by molecular markers ISSR, and to estimate the pollen viability of five genotypes. The selected ISSR primers amplified 561 bands. Of this total, 247 bands were polymorphic, representing an average of 48%. In the experiment of pollen viability, the Cabocla, Costa Rica and Flor Branca cultivars had a high pollen viability potential, standing out the Cabocla cultivar with the highest value (95.9%) among the cultivars. The ISSR markers allowed to estimate

¹Mestrando em Agronomia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, (Univasf), bolsista Facepe, Petrolina, PE.

²Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPB), bolsista Pibic - CNPq, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁴ Biólogo, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

the genetic diversity and cultivars that showed high pollen viability, can they recommend as donor genotypes of pollen in future studies of genetic improvement.

Palavras-chave: *Malpighia emarginata*, genótipo, polimorfismo, melhoramento genético.

Keywords: *Malpighia emarginata*, genotype, polymorphism, genetic improvement.

Introdução

A aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Mociño ex DC) pertence à família Malpighiaceae, originária da América Central, cujos frutos se destacam pelo elevado teor de vitamina C. A consolidação da acerola como alternativa viável à diversificação da fruticultura irrigada no Vale do São Francisco se encontra ameaçada por alguns fatores, como a suscetibilidade dos clones comerciais a nematoides formadores de galhas; carência de cultivares de altos desempenhos agrônomicos e portadores de características sensoriais e nutracêuticas que atendam às necessidades dos diversos mercados. A existência de germoplasma com variabilidade genética é requisito básico para o estabelecimento de programas de melhoramento.

Um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Aceroleira foi instalado, na Embrapa Semiárido, para reunir os principais materiais de aceroleira existentes no Brasil, com o objetivo de conservar e gerar novos genótipos. Com a crescente demanda pela fruta, tanto no mercado interno como no externo, é necessário o aumento do plantio, assim como a condução de um cultivo sustentável, com boas características agrônomicas para o consumo natural.

Para a caracterização dos acessos de um determinado BAG, uma das estratégias mais usadas se baseia em análises com uso de marcadores moleculares do tipo ISSR (Sequências Simples Repetitivas Internas). Esses marcadores permitem a 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).

A análise da viabilidade polínica é uma das técnicas que mais contribui no melhoramento genético, pois permite a seleção de genótipos mais estáveis em cruzamentos que poderão gerar novas cultivares (ROSA et al., 2006). Em aceroleira, os poucos estudos

nessa área relataram a existência de algumas cultivares com diferentes valores de viabilidade polínica, indicando a existência de instabilidade genotípica (SIQUEIRA et al., 2011).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de contribuir com a caracterização do BAG de aceroleira da Embrapa Semiárido, mediante o emprego de marcadores moleculares ISSR, buscando-se: 1) estimar a diversidade genética entre quatro cultivares de aceroleiras, 2) gerar informações para o uso de acessos em programas de melhoramento genético e 3) estimar a viabilidade polínica de cinco genótipos de aceroleiras para dimensionar seu potencial de utilização em cruzamentos dirigidos para geração de novas cultivares.

Material e Métodos

Experimento 1 – Quatro cultivares de aceroleira (Flor Branca, Okinawa, Cabocla e Rubra) provenientes do BAG de Aceroleira da Embrapa Semiárido, localizado no Campo Experimental de Bebedouro, em Petrolina, PE, foram avaliadas. As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido. A extração do DNA foi executada pelo 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 λ (5 ng, 10 ng e 20 ng), corado com brometo de etídio. As amostras foram diluídas para 10 ng/ μ L e armazenadas a -20 °C.

As reações de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas em termociclador Gene Amp 9600. Cada uma das amostras foi aferida para um volume final de 25 μ L, utilizando-se um *mix* contendo tampão 10x, MgCl₂, dNTP's, Taq polimerase, 50 ng de DNA molde, H₂O ultrapura e os iniciadores para ISSR. Foi realizado um teste preliminar com 100 iniciadores ISSR em uma das cultivares, sendo escolhidos 27 iniciadores para a aplicação nos demais genótipos em função da sua nitidez, quantidade e polimorfismo 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-se 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 com atribuição de valor 1 (um) para presença e de valor 0 (zero) para ausência de bandas.

Experimento 2 – A análise da viabilidade polínica foi realizada a partir de flores em antese. Para isso, botões florais das cultivares Flor Branca, Okinawa, Cabocla, Costa Rica e Rubra foram coletados e fixados em Carnoy 3:1 por 5 a 24 horas à temperatura ambiente, sendo estocados -20 °C até sua utilização.

Posteriormente, as anteras foram retiradas, obtendo-se os grãos de pólen, que foram corados com carmim acético a 2% (GUERRA; SOUZA, 2002). Foram preparadas, pelo menos, duas lâminas por cultivar para observação em microscópio ótico. As imagens dos grãos de pólen foram capturadas com uma câmera digital acoplada ao software Dinocapture 2.0.

O cálculo do percentual de viabilidade polínica e as medições do diâmetro equatorial foram realizados em 540 grãos de pólen por cultivar. Os grãos de pólen que coraram uniformemente foram considerados viáveis.

Resultados e Discussão

Experimento 1 – Os 27 iniciadores ISSR amplificaram 561 bandas com tamanhos que variaram entre 250-2500 pb (média de 20,77 bandas). Desse total, 25 iniciadores mostraram polimorfismos entre as cultivares, gerando 247 bandas polimórficas (média de 9,15 bandas), representando um polimorfismo médio de 48% (Tabela 1). Foram observadas 100% de bandas polimórficas para oito iniciadores. Por sua vez, dois dos iniciadores geraram apenas 3,22% e 5,26% de fragmentos polimórficos.

Os marcadores ISSR utilizados evidenciaram a existência de variabilidade genética entre as cultivares, sendo a Flor Branca a que apresentou o maior número de bandas, com média de 6,25 por iniciador (Tabela 1).

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

Primer	Sequência*	NTB	NBP	P (%)	NBG				AF (pb)
					Cabocla	Flor Branca	Rubra	Okinawa	
1-DiGA3' C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	9	8	89	3	1	2	3	250 – 1000
2-DiGT5' CR	CRGTyGTGTGTGTGTGTGT	18	12	67	4	6	4	4	400 – 1250
3-DiGT5' CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT	7	7	100	0	7	0	0	500 – 1500
4-TriCAG3' YC	CACCACCACCACCACYC	10	6	60	1	7	1	1	450 – 1600
5-TriCAC5' CR	CRCACCACCACCACCAC	10	7	70	1	6	1	2	450 – 1400
6-TriCAC5' CY	CYCACCACCACCACCAC	31	2	6	7	6	6	6	350 – 1600
7-TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG	12	12	100	4	0	4	4	500 – 1400
8-TriCAG3' RC	CAGCAGCAGCAGCAGRC	32	21	66	10	2	10	10	300 – 1400
9-TriCAG3' YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC	44	10	23	11	11	11	11	300 – 2000
10-TriGTG3' RC	GTGGTGGTGGTGGTGRC	41	2	5	10	11	10	10	350 – 2000
11-TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT	24	14	58	5	7	6	6	300 – 2000
12-TriAAC3' RC	AACAACAACAACAACRC	41	31	76	11	8	11	11	300 – 2000
13-TriACA3' RC	ACAACAACAACAACARC	25	13	52	6	5	7	7	250 – 1500
14-TriACT3' RC	ACTACTACTACTACTRC	6	6	100	0	6	0	0	500 – 1500
15-TriACG3' RC	ACGACGACGACGACGRC	32	0	0	8	8	8	8	300 – 2000
16-TriTCG3' RC	TCGTCGTCGTCGTCGRC	12	12	100	4	0	4	4	700 – 2000
17-DiGA5' CR	CRGAGAGAGAGAGAGAGA	36	15	42	8	10	10	8	300 – 2000
18-TriAGT3' RC	AGTAGTAGTAGTAGTRC	2	2	100	0	2	0	0	1000 -1250
19-TriGTA3' RC	GTAGTAGTAGTAGTARC	7	7	100	0	7	0	0	300 – 1250
20-TriGCA3' RC	GCAGCAGCAGCAGCARC	9	9	100	0	9	0	0	300 – 2000
21-DiCA	CACACACACACACACA	6	6	100	0	6	0	0	300 – 1600
22-DiCA3' RG	CACACACACACACACARG	18	9	50	5	5	4	4	250 – 1750
23-DiCA3' YG	CACACACACACACAYG	8	8	100	4	4	0	0	400 – 900
24-DiCA5' CY	CYCACACACACACACACA	44	0	0	11	11	11	11	350 – 2500
25-DiCA5' G	GCACACACACACACACA	33	8	24	9	8	8	8	350 – 2500
26-DiGA3T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	35	14	40	10	10	5	10	300 – 2500
27-DiGA3' YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	9	6	67	1	6	1	1	350 – 1000
Total		561	247	48	133	169	124	129	
P(%)		-	-	-	16,6	21,1	15,5	16,1	
Média		20,77	9,15	-	4,92	6,25	4,59	4,77	

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

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 (48%) entre as cultivares analisadas, observou-se valor médio de 9,15 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. Neste caso, mesmo se considerando que a aceroleira tem uma base genética estreita, pode ocorrer aumento da variabilidade genética durante o processo de meiose nos pomares onde sementes são utilizadas na produção de mudas.

Experimento 2 – Em relação ao experimento de viabilidade polínica, na Tabela 2, são apresentados os resultados obtidos para a estimativa de viabilidade dos grãos de pólen e seus respectivos diâmetros médios. As cultivares Cabocla, Costa Rica e Flor Branca, de um lado, apresentam potencial de viabilidade polínica alto, destacando-se a cultivar Cabocla, com maior valor (95,9%) entre as cultivares. Por outro lado, nas cultivares Rubra e Okinawa, observou-se baixa viabilidade polínica, com valores médios de 20,6% e 5,5%, respectivamente. Valores semelhantes também foram obtidos por Siqueira et al. (2011) que estudaram a viabilidade polínica e a eficiência de polinização de três genótipos de aceroleiras cultivadas no Município de Petrolina, PE.

Tabela 2. Percentual de viabilidade polínica e diâmetro médio de grãos de pólen de cinco cultivares de aceroleira (*Malpighia emarginata* Sessé & Mociño ex DC) empregadas em plantios no Submédio do Vale do São Francisco.

Cultivares	Grãos de pólen viáveis (%)	Grãos de pólen inviáveis (%)	Grãos de pólen viáveis (Diâmetro \pm DP μ m)	Grãos de pólen inviáveis (Diâmetro \pm DP μ m)
Cabocla	95,9	4,1	35,55 \pm 2,23	23,53 \pm 3,76
Costa Rica	93,1	6,9	37,18 \pm 3,09	28,04 \pm 2,52
Flor Branca	89,1	10,9	36,95 \pm 3,34	28,06 \pm 1,90
Okinawa	5,5	94,5	31,51 \pm 6,13	27,38 \pm 3,05
Rubra	20,6	79,4	37,30 \pm 4,64	30,28 \pm 2,46

Conclusões

Os marcadores ISSR são eficientes para estimar a diversidade genética entre genótipos de aceroleira.

As informações geradas sobre o polimorfismo entre as cultivares contribuem com programas de melhoramento genético.

As aceroleiras 'Cabocla', 'Costa Rica' e 'Flor Branca' apresentam viabilidade polínica alta e podem ser recomendadas para a extração e utilização de pólen em trabalhos com melhoramento genético.

Referências

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

GUERRA, M.; SOUZA M. J. Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. In: GUERRA, M.; SOUZA, M. J. (Ed.). **Como analisar os cromossomos mitóticos**. São Paulo: FUNPEC, 2002. p. 23-38.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? **ASM Science Journal**, Kuala, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.

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.

ROSA, P. S.; CORRÊA, M. G. S.; NASCIMENTO, A. J.; BRAMMER, S. P.; VIÉGAS, J. **Análise de tétrades e grãos de pólen em triticales hexaplóide** Pelotas: UFPel, 2006.

SIQUEIRA, K. M. M.; MARTINS, C. F.; KIILL, L. H. P.; Silva, L.T. Estudo comparativo da polinização em variedades de aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC, Malpighiaceae). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, p. 18-25, 2011.