

Diversidade Genética em Acessos de Goiabeira (*Psidium guajava* L.) de Diferentes Origens Geográficas Avaliadas por Marcadores Microssatélites

Genetic Diversity Among Guava Accessions (*Psidium guajava* L.) of Different Geographical Origins Estimated by Microsatellite Markers

*Maria Maiany de Oliveira*¹; *Carlos Antônio Fernandes Santos*²; *Luiz Cláudio Corrêa*³; *Jucilene S. Araújo*¹; *Hugo Leonardo C. Ribeiro*¹

Resumo

Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética em indivíduos de goiabeira de diferentes áreas geográficas brasileiras, presentes no Banco Ativo de Germoplasma de *Psidium* da Embrapa Semi-Árido, para orientar trabalhos de melhoramento genético. Foram genotipados com marcadores SSR 52 acessos de goiabeiras e um de araçazeiro, de acordo com o número de acessos por estado brasileiro: MA - 7, PI - 3, PE - 6, SE - 6, RO - 5, AM - 6, RS - 4, GO - 5, RR - 5, e BA - 4, a cultivar Paluma e um acesso de araçazeiro (BA). Após a amplificação pela técnica PCR, fragmentos de DNA foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Dentre os 16 *primers* de SSR utilizados apenas dez apresentaram bandas bem definidas adequadas para genotipagem. Observaram-se grupos de goiabeiras para os estados de Goiás, Roraima e Rondônia e uma mistura nos demais acessos, independente do estado de origem,

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, BR 428, Km 125, Zona rural, Caixa postal 23, Petrolina, PE - CEP 56302-970; ³Assistente da Embrapa Semi-Árido; casantos@cpatsa.embrapa.br.

indicando que os acessos foram dispersos livremente entre os estados brasileiros avaliados (exceto GO, RR e RO). O araçazeiro foi colocado fora dos agrupamentos de goiabeira, enquanto a cultivar Paluma posicionou-se entre dois acessos de goiabeira de PE.

Palavras - chave: SSR. *Psidium* spp. Dendrograma. PCR.

Introdução

A goiabeira é uma planta originária da América, havendo uma indeterminação quanto ao local de origem, que se situa provavelmente entre o México e a América do Sul. A grande e rápida difusão da planta pode ser atribuída à sua facilidade em multiplicar-se por semente e à sua grande rusticidade, o que facilita o seu desenvolvimento em solos pobres em fertilidade e com baixa retenção de umidade (ZAMBÃO; BELLINTANI NETO, 1998).

Segundo Gonzaga Neto (2001), os estados brasileiros de São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco, em conjunto, respondem por 80 % da produção nacional de goiaba. A cultura da goiaba no Brasil, principalmente a de polpa vermelha, encontra-se em um momento especial nesse começo de século, com a perspectiva de conseguir melhor posição na comercialização de frutas e seus derivados. As exportações de goiaba e seus produtos industrializados são ainda incipientes, o que faz a produção brasileira depender exclusivamente do mercado interno (COSTA; COSTA, 2003).

Atualmente, existem inúmeras técnicas de biologia molecular que podem ser usadas para detectar variabilidade genética de DNA, entretanto, ainda são escassas as informações de caracterização com marcadores de DNA para a goiabeira e inexistentes para araçazeiros (RODRIGUEZ et al., 2004).

Os marcadores baseados na amplificação de microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) têm expressão codominante e multialelismo, e são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo na terminologia de marcadores moleculares. (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Este trabalho visou avaliar a variabilidade genética em acessos de goiabeira de diferentes origens geográficas brasileiras, presentes no Banco Ativo de Germoplasma de *Psidium* da Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE, para orientar trabalhos de recursos genéticos e melhoramento.

Material e Métodos

Foram analisados 52 acessos de goiabeiras e um de araçazeiro para serem genotipadas com marcadores SSR, de acordo com o seguinte número de acessos por Estado brasileiro: Maranhão (MA) - sete; Piauí (PI) - três; Pernambuco (PE) - seis; Sergipe (SE) - seis; Rondonia (RO) - cinco; Amazonas (AM) - seis; Rio Grande do Sul (RS) - quatro; Goiás (GO) - cinco; Roraima (RR) - cinco; e Bahia (BA) - quatro, a cultivar Paluma e um acesso de araçazeiro (BA). O material vegetal de cada amostra foi coletado no Banco Ativo de Germoplasma de *Psidium* da Embrapa Semi-Árido, mantido no Campo Experimental de Bebedouro, Petrolina, PE. O DNA genômico foi extraído de folhas jovens, congeladas com nitrogênio líquido e pulverizado com um almofariz e pilão. O método de extração utilizado foi o CTAB 2x seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990), modificado por Santos et al. (2008), com alterações em: 6.000 e 10.000 rpm na primeira e na segunda centrifugação, respectivamente, 2,0 % betamercaptoetanol, e incubação a 60°C durante 30 min para todas as amostras. Após a adição do tampão Tris - EDTA, o DNA foi tratado com solução RNase para remover co-RNAs isolados. A quantificação e integridade do DNA genômico foram observadas em géis 0.8 % de agarose comum, seguida pelo armazenamento a -20°C.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador, conforme o recomendado por Risterucci et al. (2005) com as seguintes modificações: foram usadas duas temperaturas de anelamento com 56°C ou 60°C, 2,5 mM de MgCl₂ e com o volume final de 10 µL. O DNA total foi diluído para 10 ng/µL. Após a amplificação, os fragmentos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, conforme descrito por Creste et al. (2001). Os 16 *primers* avaliados foram: mPgCIR227, mPgCIR228, mPgCIR229, mPgCIR233, mPgCIR236, mPgCIR242, mPgCIR243, mPgCIR246, mPgCIR247, mPgCIR249, mPgCIR251, mPgCIR252, mPgCIR253, mPgCIR255, mPgCIR256, mPgCIR257.

A distância de similaridade do coeficiente de Jaccard foi adotada para estimar a distância para cada par de acessos individual. A matriz de similaridade foi então usada para construir um dendrograma, segundo o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), disponível no *software* NTSYS (ROHLF, 1989).

Resultados e Discussão

Dentre os 16 *primers* de SSR utilizados, apenas dez apresentaram bandas bem definidas (Fig. 1), adequadas para genotipagem: mPgCIR227, mPgCIR242, mPgCIR246, mPgCIR247, mPgCIR249, mPgCIR251, mPgCIR252, mPgCIR255, mPgCIR256, mPgCIR257. Sessenta e sete alelos foram anotados a partir de dez marcadores SSR.

Observou-se que grupos de goiabeiras pertencentes aos estados de GO, RR e RO possuem uma maior proximidade genética (Fig. 2), sugerindo que a amostragem por estado e região geográfica foi uma boa estratégia. Observou-se também uma mistura genotípica entre as goiabeiras, independentemente do estado de origem, indicando que as mesmas foram dispersas livremente de um lugar para outro entre os estados brasileiros avaliados (exceto GO, RR e RO). A esse respeito, Upadhyay e Murty (1970) acrescentaram que a deriva genética e a seleção em diferentes ambientes podem causar maior divergência que a distância geográfica. A localização externa do acesso de araçazeiro em relação aos grupos de goiabeira indicou que o dendrograma foi de boa adequação. A cultivar Paluma constituiu-se em dois acessos de goiabeira de Pernambuco.

O número de *primers* utilizados neste trabalho foi suficiente para os estudos de diversidade em goiabeira, pois, de modo geral, são necessários dez *primers* microsatélites para os estudos de diversidade, e novas investigações serão realizadas para outros genótipos brasileiros.

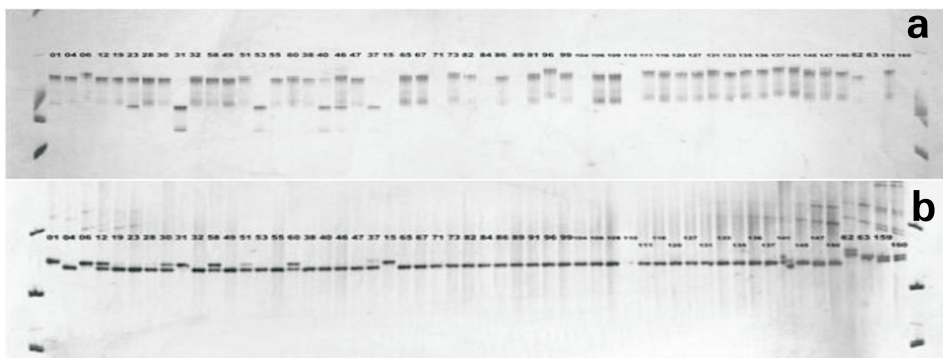


Fig. 1. Representação de géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata com 52 acessos de goiabeira e um de araçazeiro genotipadas com os *primers* mPgCIR251 (a) e mPgCIR252 (b), respectivamente.

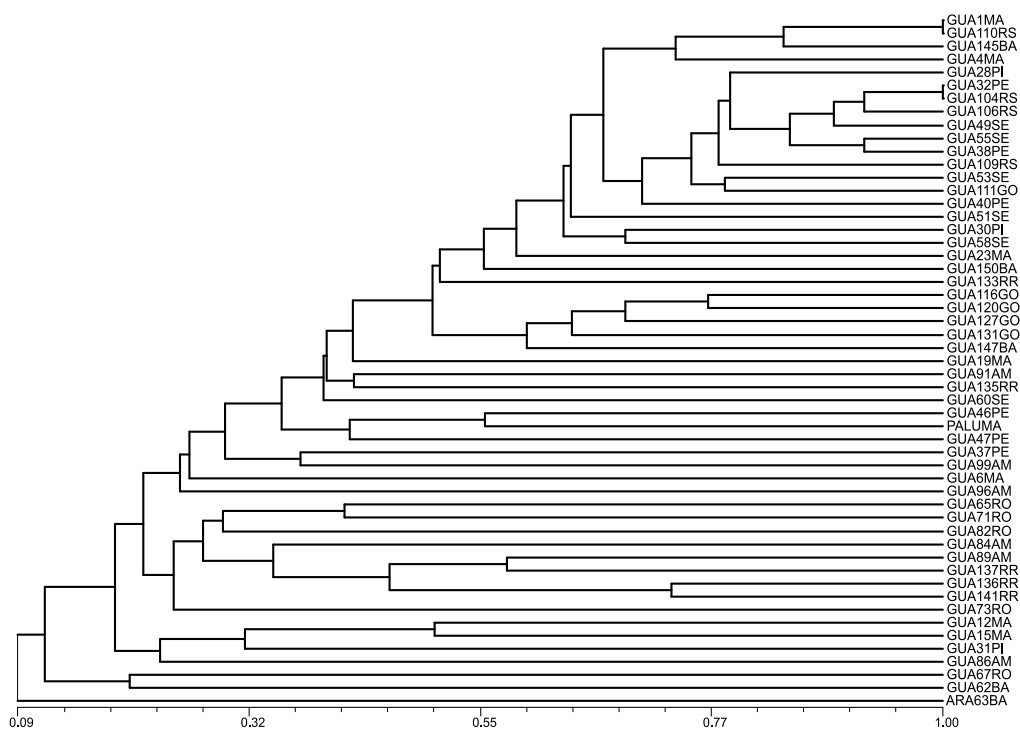


Fig. 2. Dendrograma UPGMA do coeficiente de Jaccard entre 52 acessos de goiabeira e um de araçazeiro originados de dez diferentes estados brasileiros analisados com 67 alelos dos dez marcadores SSR. Valor co-fenético = 0,86.

Conclusões

1. Foram observados grupos entre os acessos de goiabeira pertencentes aos estados de GO, RR e RO, sugerindo que a amostragem por estado e região geográfica foi uma boa estratégia.
2. Foi observada uma mistura genotípica entre as goiabeiras dos estados de MA, SE, PI, BA, RS, AM e PE indicando que as mesmas foram dispersas livremente de um lugar para outro entre esses estados.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Comunidade Européia (GUAVAMAP: FP6-INCO-DEV2-CT 015111) pelo apoio financeiro. Pelo apoio do orientador a todos que fazem parte do laboratório de Genética.

Referências

- COSTA, A. de F. S. da; COSTA, A. N. da. (Ed.). **Tecnologias para a produção de goiaba**. Vitória: Incaper, 2003. 341 p.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Adelaide, n. 9, p. 299-306, 2001.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-15, 1990.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA - CENARGEN, 1995. 220 p. (EMBRAPA - CENARGEN. Documentos, 20).
- GONZAGA NETO, L. Cultivo da goiabeira. In: GONZAGA NETO, L. (Ed). **Goiaba: produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2001. p. 2-9. (Frutas do Brasil, 17).
- RISTERUCCI, A. M.; DUVAL, M. F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular ecology notes**, [Hoboken], v. 5, p. 745-748, 2005.
- RODRIGUEZ, N. N.; VALDES-INFANTE, J.; BECKER D.; VELASQUEZ, B.; COTO, O.; RITTER, E.; ROHDE, W. Morphological, agronomic and molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.). **Journal Genetics & Breeding**, Rome, n. 58, p. 79-90, 2004.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Software, 1989. Version 1.80.

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

UPADHYAY, M. K.; MURTY, B. R. Genetic divergence in relation to geographical distribution in pearl millet. **The Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, [Jodhpur], v. 30, n. 3, p. 15-704, 1970.

ZAMBÃO, J. C.; BELLINTANI NETO, A. M. **Cultura da goiabeira**. Campinas: CATI, 1998. 23 p. (Boletim técnico, 236).