

EFICIÊNCIA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA DETECÇÃO DE POLIMORFISMO EM GOIABEIRAS SILVESTRES

Angélica Maria Nogueira¹, Luína Ribeiro Noia², Érica Mangaravite³, Adésio Ferreira⁴
Marcia Flores da Silva Ferreira⁴

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Produção Vegetal,
Alto Universitário S/N, CEP: 29.500.000, Alegre, Espírito Santo, ¹axnogueira@hotmail.com,
²luina_noia@hotmail.com, ⁴marciaflores@cca.ufes.br; ⁵adesioferreira@gmail.com.
³Universidade Federal de Viçosa, ericaccaufes@gmail.com.

Resumo- A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma planta originária da América, amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Para *P. guajava* o uso de marcadores moleculares ainda é restrito, mas já se apresenta como uma ótima alternativa aos programas de melhoramento vegetal da cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da coleção de *primers* desenvolvidos por Risterucci et al. (2005) em detectar polimorfismo entre 37 genótipos de goiabeiras silvestres na região sul do Espírito Santo. Os dados obtidos após amplificação foram submetidos a análises estatísticas, calculando-se a Heterozigosidade observada (H_o) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). Os valores de H_o foram baixos, caracterizando homozigose da maioria dos locos nas plantas avaliadas e os valores de PIC foram relativamente altos para alguns *primers*, o que retrata uma grande diversidade de *P. guajava* nos municípios da região sul do ES e a sua eficiência na detecção de polimorfismo entre indivíduos da espécie. Este trabalho visa o conhecimento da diversidade genética entre e dentro de populações silvestres contribuindo para a estruturação de programas de conservação e de melhoramento genético da cultura.

Palavras-chave: *Psidium guajava*, melhoramento vegetal, diversidade.

Área do Conhecimento: Biotecnologia

Introdução

A goiabeira pertence ao gênero *Psidium*, da família *Myrtaceae*, que compreende de 110 a 130 espécies de árvores e arbustos. *Psidium guajava* é a espécie mais importante economicamente do gênero. É uma planta originária da América, uma frutadeira arbórea perene, amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América e na Austrália (TODA FRUTA, 2003). No Brasil, a cultura se destaca por ser cultivada por agricultores familiares, gerar grande quantidade de empregos e ser de alta rentabilidade (MENDES et al., 2008).

Para *P. guajava* o uso de marcadores moleculares ainda é restrito no Brasil, mas é uma ótima alternativa aos programas de melhoramento vegetal na detecção de polimorfismos genéticos entre indivíduos (BUSO, 2003). Estes marcadores possibilitam a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente e a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta (FALEIRO, 2007).

Risterucci et al. (2005) foram os primeiros a desenvolver uma coleção de 23 pares de *primers*

microsatélites potencialmente úteis na avaliação da diversidade genética de *Psidium*, e importantes ao melhoramento genético de *P. guajava*. Marcadores microsatélites, baseados em PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), são codominantes, altamente polimórficos, de alta reprodutibilidade, frequentes, não influenciados pelo ambiente e distribuídos ao acaso no genoma (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Estudos de diversidade genética de goiabeiras do Brasil são importantes para a caracterização de seus acessos e populações naturais do país. Neste trabalho objetivou-se avaliar a capacidade da coleção de *primers* desenvolvida por Risterucci et al. (2005) em gerar polimorfismo entre 37 genótipos de goiabeiras silvestres de municípios da região sul do Espírito Santo.

Metodologia

Foram coletados, de novembro de 2009 a março de 2010, folhas e frutos de 37 goiabeiras silvestres de municípios da região sul do Espírito Santo. Em Alegre foram coletados 17 acessos em diferentes localidades (Barra de Santa Angélica

(03); Rive (05) e Trevo (04)). Em Guacuí foram amostrados 11 genótipos (Sede (05); distrito de São Pedro (06)); e, em Cachoeiro de Itapemirim nove (Manoel Caetano (05) e Sede (04)). As amostras foram preferencialmente de plantas antigas da região. As sementes foram plantadas em vasos na casa de vegetação da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES).

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de cada planta de *P. guajava* pelo método CTAB seguindo o protocolo de Doyle & Doyle (1990), modificado por Santos et al. (2008). Após a extração, foram verificadas a integridade e a concentração das amostras, por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Foram avaliados 23 *primers* microssatélites desenvolvidos por Risterucci et al. (2005) entretanto 17 apresentaram bandas bem definidas e com boa qualidade de amplificação: mPgCIR02, mPgCIR07, mPgCIR08, mPgCIR09, mPgCIR10, mPgCIR11, mPgCIR13, mPgCIR15, mPgCIR16, mPgCIR17, mPgCIR18, mPgCIR19, mPgCIR20, mPgCIR21, mPgCIR22, mPgCIR25 e mPgCIR26.

Para a amplificação de cada *primer* foi utilizado um volume de reação de 15 μ L contendo: 60ng de DNA genômico, 0,3 μ M de cada *primer*, tampão KCl 1X, 2,5mM de MgCl₂, 0,4mM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 1,0 unidade

de Taq DNA polimerase (Fermentas). O programa utilizado para amplificação foi o mesmo utilizado por Risterucci et al. (2005), realizado em termociclador com 4 minutos a 94°C, 30 ciclos com 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C, sendo a extensão final de 8 minutos a 72°C. Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados e visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e fotografado em ultravioleta (UV). Para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados foram utilizados marcadores de peso molecular de 50 pb. Os dados obtidos após amplificação foram submetidos a análises estatísticas, segundo o programa Genes (CRUZ, 2001).

Resultados

A Tabela 1 mostra a frequência alélica, H_0 (frequência de heterozigotos numa população supostamente em equilíbrio de Hardy - Weinberg), o número de alelos por loco amplificados por cada microssatélite de acordo com a Identidade de Nei (1972), juntamente com a H_0 e número de alelos amplificados apresentados por Risterucci et al. (2005) durante o desenvolvimento dos *primers*, para fins de comparação.

Tabela 1. Primers, H_0 , PIC e número de alelos dos municípios de Alegre, Guaçuí e Cachoeiro de Itapemirim comparados com a H_0 e número de alelos analisados por Risterucci et al. (2005)

Marcador	Alegre			Guaçuí			Cachoeiro de Itapemirim			Risterucci et al. (2005)	
	H_0	PIC	N. alelo	H_0	PIC	N. alelo	H_0	PIC	N. alelo	H_0	N. alelo
mPgCIR 02	0.1107	0.1046	2	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	1	0,417	3
mPgCIR 07	0.0571	0.0555	2	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	1	0,5	5
mPgCIR 08	0.4152	0.3290	2	0.3967	0.3180	2	0.1975	0.1780	2	0,5	4
mPgCIR 09	0.6543	0.5799	3	0.5413	0.4632	3	0.4688	0.3589	2	0,417	5
mPgCIR 10	0.2637	0.2289	2	0.1800	0.1638	2	0.4688	0.3589	2	0,417	5
mPgCIR 11	0.2188	0.1948	2	0.3967	0.3180	2	0.1975	0.178	2	0,25	5
mPgCIR 13	0.5260	0.4365	3	0.6446	0.5721	3	0.4938	0.3719	2	0,75	5
mPgCIR 15	0.3045	0.2809	3	0.4298	0.3855	3	0.4938	0.4377	3	0,333	5
mPgCIR 16	0.0000	0.0000	1	0.2975	0.2533	2	0.0000	0.0000	1	0,667	7
mPgCIR 17	0.2612	0.2448	3	0.0000	0.0000	1	0.4938	0.3719	2	0,417	4
mPgCIR 18	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	1	0.0000	0.0000	1	0,5	3
mPgCIR 19	0.1644	0.1572	3	0.4339	0.3398	2	0.4444	0.3457	2	0,417	5
mPgCIR 20	0.2076	0.1861	2	0.4628	0.3557	2	0.0000	0.0000	1	0,333	4
mPgCIR 21	0.4689	0.4011	3	0.6653	0.5912	3	0.4444	0.3457	2	0,5	4
mPgCIR 22	0.5467	0.4486	3	0.3140	0.2918	3	0.1975	0.1780	2	0,333	5
mPgCIR 25	0.4204	0.3778	3	0.4339	0.3398	2	0.4766	0.4275	3	0,5	6
mPgCIR 26	0.3698	0.3242	3	0.6600	0.5862	3	0.2266	0.2146	3	0,167	7
Média	0.3011	0.2604	2,3888	0.3254	0.2766	2,0555	0.2558	0.2093	1,8333	0,4363	4,8235

Segundo Ott (1992), um loco é considerado polimórfico quando $H_0 \geq 0,1$ que corresponde aproximadamente, a situação em que o alelo mais abundante tem frequência menor que 0,95 e, altamente polimórfico quando $H_0 \geq 0,7$. Nos dezessete *primers* analisados, a H_0 variou de 0 a 0,6543, com média de 0,3011 em Alegre; de 0 a 0,6653, com média de 0,3254 em Guaçuí; e de 0 a 0,4938 com média de 0,2558 em Cachoeiro de Itapemirim. Esses valores são inferiores aos encontrados por Risterucci et al. (2005) e também por Valdés-Infante et al. (2007) na avaliação de 34 cultivares e acessos, com sete *primers* microsatélites.

A H_0 e o PIC foram nulos nos *primers* mPgCIR 16 e 18 em Alegre ; mPgCIR 02, 07, 17 e 18 em Guaçuí; e, 02, 07, 16, 18 e 20 em Cachoeiro. Ambos os *primers* apresentaram de um a quatro alelos por loco, entretanto, observou-se o predomínio expressivo de apenas um alelo com frequência de 1, o que limitou a presença de heterozigotos na população.

Todos os valores de PIC obtidos foram inferiores aos de heterozigosidade. Os valores variaram de 0 a 0,5799 com média de 0,2604 em Alegre; de 0 a 0,5912 com média de 0,2766 em Guaçuí; e, de 0 a 0,4377, com média de 0,2093 em Cachoeiro.

O primer mPgCIR 09 em Alegre; mPgCIR 13, 21 e 26 em Guaçuí, demonstraram ser eficientes na detecção de heterozigosidade na população. Ambos, com PIC superiores a 0,500. *Primers* com PIC variando entre 0,427 a 0,468 como os primers mPgCIR 13 e 22 em Alegre, mPgCIR 09 em Guaçuí, e, 15 e 25 em Cachoeiro também foram eficientes na detecção de heterozigosidade nesta população.

O número de alelos amplificados não foram compatíveis aos encontrados por Risterucci et al. (2005), inferindo a homogeneidade da população ou a presença de alguns alelos diferentes aos detectados por estes autores.

Discussão

O valor de PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador, por considerar o número de alelos por loco, e a frequência relativa desses alelos. O alto índice de PIC e H_0 nulo encontrados sugerem que os genótipos avaliados são provenientes de sucessivas gerações com grande percentagem de endogamia ou uma demasiada similaridade entre as bases genéticas das mesmas, causando o predomínio de homozigose na população.

Nos dezessete *primers* analisados para as quatro populações, a H_0 foi baixa. Risterucci et al. (2005), ao utilizar a mesma coleção de pares de *primers* microsatélites obtiveram valores H_0

variando de 0,25 a 0,75 com média de 0,4363. Valdés-Infante et al. (2007) também encontraram valores superiores na avaliação de 34 cultivares e acessos, com sete *primers* microsatélites.

Os valores de PIC obtidos também foram inferiores aos valores detectados por Valdés-Infante et al. (2010) que ao avaliar diferentes espécies de *Psidium*, inclusive *P. guajava*, juntamente com outros gêneros da família *Myrtaceae* coletados em diferentes países e regiões, com quatro *primers* microsatélites obtiveram valores que variaram de 0,63 a 0,90, com média de 0,76. Entretanto, ao comparar os acessos utilizados no trabalho citado, que variam em espécie e gênero, com as populações avaliadas neste trabalho, percebe-se que os valores encontrados nesta última são suficientemente altos para caracterizar uma grande diversidade de *P. guajava* que podem fornecer características desejáveis ao melhoramento genético da espécie.

Os valores de PIC indicam ainda que os *primers* microsatélites utilizados são eficientes na identificação de polimorfismo dentro de populações de *P. guajava*, destacando-se o primer 09 em Alegre, 13, 21 e 26 em Guaçuí e 10 e 15 em Caparaó, com valores superiores a 0,500. Os *primers* mPgCIR 13 e 22 em Alegre, 09 em Guaçuí, e, 15 e 25 em Cachoeiro com PIC variando entre 0,427 a 0,468, também foram eficientes na detecção de heterozigosidade nesta população.

Assim, é possível afirmar que os *primers* microsatélites avaliados são ótimas ferramentas para o estudo de diversidade genética em *P. guajava*.

Conclusão

Os valores de H_0 baixos, caracterizam homozigose da maioria dos locos nas plantas avaliadas. Para alguns primers valores de PIC relativamente altos retratam eficiência na detecção de polimorfismo entre indivíduos da espécie.

Resultados deste estudo são importantes para o conhecimento da diversidade genética entre e dentro de populações de ocorrência espontânea contribuindo para a estruturação de programas de conservação e de melhoramento genético da cultura.

Agradecimentos

Universidade Federal do Espírito Santo, FAPES e CNPq.

Referências

- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores Moleculares. 2. ed. Viçosa: UFV, 532 p. 2009.
- BUSO, G.S.C. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. p. 46-50, 2003.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. Viçosa: Ed. UFV, p. 323, 2011.
- CRUZ, C.D. GENES – versão Windows. Viçosa: Ed. UFV, 642p, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. p.13-15, 1990.
- FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Ed.Embrapa, 2007.
- MENDES, B. O. T.; FREITAS, G. B.; BARROS, J. N. G.; RESENDE L. A.; LIU, I. M.; LIU, Y. M.; MATTOS, U. J. B. M.; ROCHA, M. S.; FREITAS, L. M. S. Impacto de aporte tecnológico, na produção familiar de goiaba, na região da zona da mata mineira. **Congresso Brasileiro de Fruticultura, 20; Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**. Vitória-ES: 2008.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**., v.106, p.238-292, 1972.
- NETO, L. G; SOARES, J.M. A Cultura da Goiaba. **Serviço de Produção de Informação**, SPI. Brasília-DF: EMBRAPA, 1995.
- OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **American Journal of Human Genetics**, v.51, p. 283-290, 1992.
- RISTERUCCI, A. M.; DUVAL, M. F.; ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**. n. 5. p. 745–748. 2005.
- SANTOS, C. A. F.; CASTRO, J. M. C., SOUZA, F. F.; VILARINHO, A. A.; FERREIRA, F. R.; PÁDUA, J. G.; BORGES, R. M. E.; BARBIERI, R. L.; SOUZA, A. G. C.; RODRIGUES, M. A. Preliminary characterization of *Psidium* germplasm in different Brazilian ecogeographic regions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 437-440, 2008.
- TODA FRUTA. Característica da Goiaba. Disponível em:<http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostr_conteudo.asp?conteudo=1562>. Acesso em: 02 de abril de 2010.
- VALDÉS-INFANTE . Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae. **Revista Colombiana de Biotecnología**. p. 64-76, 2010.
- VALDÉS INFANTE, J.; RODRÍGUEZ, N. N.; BECKER, D.; VELÁZQUEZ, B.; SOURD, D.; ESPINOSA, G.; ROHDE, W. Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germoplasma collection in cuba. **Cultivos tropicales**. V. 28, no. 3, p. 61-67. 2007.