

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE BIRIBÁ UTILIZANDO AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA

<sup>1</sup>Guilherme Ferreira Sirtoli, <sup>1</sup>Paula da Silva Mendel, <sup>2</sup>Rodrigo Monte Lorenzoni, <sup>1</sup>Isabela Faria Correa, <sup>3</sup>Franciele Barros de Souza Sobreira, <sup>3</sup>Taís Cristina Bastos Soares

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, guilhermeferreirasirtoli@gmail.com, paula.mendel@hotmail.com, isabelafaria.correa@gmail.com

<sup>2</sup>Sebra Agrícola, Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Rua Santa Rosa, Chácara G8, 78640-000, Canarana-MT, Brasil, rodrigo@sebra.ag

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, francielesouza@gmail.com, tcbsoares@gmail.com

### Resumo

O biribazeiro (*Annona mucosa* Jacq.) pertencente à família *Annonaceae*, tem o Brasil como seu centro de origem. É uma planta cultivada com frequência em pomares domésticos e seu fruto é altamente nutritivo. Compreender a variabilidade genética do biribá é importante para o direcionamento dos programas de melhoramento e, dentre as ferramentas moleculares disponíveis, o uso de marcadores microssatélites (SSR) é frequentemente utilizado. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética entre os indivíduos de biribá através da amplificação heteróloga de *primers* SSR desenvolvidos para *Annona cherimola* em *A. mucosa*. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e fotografados em fotodocumentador. Observou-se 40% de transferibilidade entre as espécies. Os marcadores apresentaram 77,33% de polimorfismo, o qual indica um alto nível de diversidade genética entre os indivíduos. Ouve uma menor dissimilaridade entre os indivíduos 11 e 12 e uma maior entre os indivíduos 1 e 6. Os marcadores SSR apresentam potencial para transferibilidade e permitiram avaliar a diversidade genética entre os acessos.

**Palavras-chave:** Transferibilidade. Marcadores moleculares. Poliploidia. Microssatélites.

**Área do Conhecimento:** Agronomia.

### Introdução

O biribazeiro (*Annona mucosa* Jacq), é uma espécie que tem o Brasil como centro de diversidade e ocorre nos biomas da Floresta Atlântica e Amazônica, encontrada de norte a sul no país. Apresenta como sinônimos *Annona obtusiflora*, *Rollinia mucosa* subsp. *aequatorial*, *Rollinia orthopetala*, *Annona reticulada* var. *Mucosa*. Além disso, o biribazeiro destaca-se por estar entre as espécies da família *Annonaceae* que apresentam tanto importância econômica quanto para manutenção da biodiversidade (SANTOS *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2010; MENDES-SILVA *et al.*, 2023).

Do ponto de vista econômico, essa família é de grande relevância, uma vez que fornece uma fonte significativa de frutos comestíveis, é utilizada como matéria-prima na indústria de cosméticos e perfumes, e também atua na produção de medicamentos (COSTA *et al.*, 2008).

Devido à importância das anonáceas para agricultura e industrial farmacêutica, estudar suas características morfológicas e molecular proporciona um entendimento mais aprofundado dos recursos genéticos e facilita a seleção de populações e/ou plantas com características desejáveis para o cultivo (FONSECA E RIBEIRO, 1992). Além disso, os marcadores moleculares permitem a geração de um volume substancial de informações sobre a diversidade genética do germoplasma utilizado por melhoristas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Os marcadores moleculares destacam-se por sua independência em relação ao ambiente e ao estado fisiológico do indivíduo (LANZA *et al.*, 2000). Entre os marcadores moleculares, os microssatélites, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR), são amplamente

empregados em estudos com espécies de interesse agrônomo devido às suas várias vantagens em comparação com outros tipos de marcadores. Estas vantagens incluem a sua abundância no genoma, sua natureza multialélica, seu caráter codominante, alto grau de polimorfismo, excelente reprodutibilidade e facilidade de transferência entre diferentes populações (CRUZ *et al.*, 2011; CAIXETA *et al.*, 2013; COSSON *et al.*, 2014).

No entanto, é válido salientar que o desenvolvimento de marcadores SSR é um processo complexo que requer a criação de bancos genômicos para o design e síntese de *primers* específicos. Esse processo pode ser dispendioso, especialmente se os recursos necessários não estiverem disponíveis para a espécie sob análise (VARSHNEY *et al.*, 2002; FALEIRO, 2007).

Outra alternativa passível de ser utilizada quando não disponível marcadores da espécie em foco é a transferibilidade de *primers* heterólogos, já que em alguns casos se tem a conservação de sítios de microssatélites entre espécies (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). O biribá não possui marcadores moleculares específicos de sua espécie, dificultando as análises gênicas da mesma.

Por isso, objetivou-se com este trabalho estimar a diversidade genética de genótipos de biribá através da amplificação heteróloga de primers SSR desenvolvidos em *A. cherimola* Mill.

## Metodologia

Os 16 acessos de *A. mucosa* utilizados foram provenientes da Coleção de Trabalho do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAEE/ UFES).

Foram selecionadas folhas jovens, sadias e completamente expandidas para a extração de DNA, a qual foi feita de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações.

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

Inicialmente foram transferidos para tubos *ependorf* de 2 mL aproximadamente 300 mg de tecido vegetal macerado em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 800  $\mu$ L de tampão de extração (NaCl 1,4 mol.L<sup>-1</sup>; Tris-HCl pH 8 a 0,1 mol.L<sup>-1</sup>; EDTA pH 8 a 20 mmol.L<sup>-1</sup>; PVP 1%; CTAB 2%;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 %) e a amostra foi agitada em vórtex. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 30 min a 65°C em banho-maria e homogeneizadas a cada 10 min. Após a incubação foram adicionados 650  $\mu$ L de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) (24:1) e os tubos foram homogeneizados até formar uma emulsão, onde em seguida foram centrifugados a 12000 rpm por 10 min. Logo depois, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 2 mL e adicionados 200  $\mu$ L de tampão de extração e 650  $\mu$ L de CIA, seguido de homogeneização e centrifugação a 12000 rpm por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo e procedeu com a adição de 650  $\mu$ L de CIA e centrifugação a 12000 rpm por 10 min. Posteriormente a fase aquosa foi transferida para novo tubo onde o DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol gelado + 230  $\mu$ L de Acetato de amônio e então homogeneizados e centrifugados a 12000 rpm por 10 min. Após a formação do precipitado a parte aquosa foi descartada e o *pellet* lavado com 250  $\mu$ L de etanol 70% por 3 vezes. Após retirada do álcool e secagem do *pellet*, foi feita a ressuspensão do mesmo em 40  $\mu$ L de água com RNase (40  $\mu$ g/mL) e incubados em banho-maria a 37 °C por 30 min.

Ao final da extração, as amostras foram quantificadas em Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific) e a integridade foi confirmada em eletroforese em gel de agarose 0,8% aplicando-se 3  $\mu$ L da amostra de DNA e 3  $\mu$ L do reagente Gelred.

Para a avaliação de transferibilidade, foram utilizados 30 pares de *primers* desenvolvidos para *A. cherimola*.

As condições para as reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram ajustadas com base na temperatura de anelamento dos *primers*. O mix de PCR foi composto de 30 ng de DNA, tampão (10 mmol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl), 2,5 mmol.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> de cada dNTP, 0,2  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> de cada *primer*, 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L de BSA, 1U de Taq e água de osmose autoclavada para completar o total de 15  $\mu$ L.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos com 94 °C por 45 segundos, anelamento por 45 segundos, a temperatura de anelamento variou de acordo com o par de *primers* e extensão 72 °C por 30 segundos; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com espessura de 1mm, a qual obteve melhor resolução, e fotografados em fotodocumentador *ChemiDoc MP Imaging System* (Biorad)®.

A análise de transferibilidade foi realizada pela porcentagem de *primers* que obtiveram amplificação com bandas nítidas e bem definidas passíveis de serem avaliadas. As informações obtidas a partir dos marcadores SSR selecionados foram utilizadas para avaliar o grau de dissimilaridade genética entre os genótipos avaliados. Os produtos amplificados foram avaliados como presença (1) ou ausência (0) de bandas e então gerada uma matriz binária. Os valores de dissimilaridade genética foram estimados através do complemento aritmético do índice de Jaccard, gerando uma matriz de dissimilaridade.

Os dados obtidos por meio das análises dos fragmentos amplificados foram utilizados para calcular o conteúdo de informação dos polimorfismos (PIC) como descrito por Anderson *et al.* (1993).

As médias das dissimilaridades genéticas foram utilizadas para a análise de agrupamento dos indivíduos, pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*), o que permitiu gerar um dendrograma para análises de proximidade entre os acessos.

Calculou-se o coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de dissimilaridades genéticas e a matriz dos valores cofenéticos a fim de verificar a consistência do agrupamento.

As análises de divergência genética e de agrupamento foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

## Resultados

Tendo em vista a análise da diversidade genética entre os diferentes genótipos de biribá, inicialmente foram testados 30 pares de primers de *A. cherimola* em 16 indivíduos de *A. mucosa*, onde apenas 12 pares de primers apresentaram bandas nítidas e bem definidas. Os demais não amplificaram ou apresentaram amplificação inespecífica, tendo uma taxa de transferibilidade de 40%.

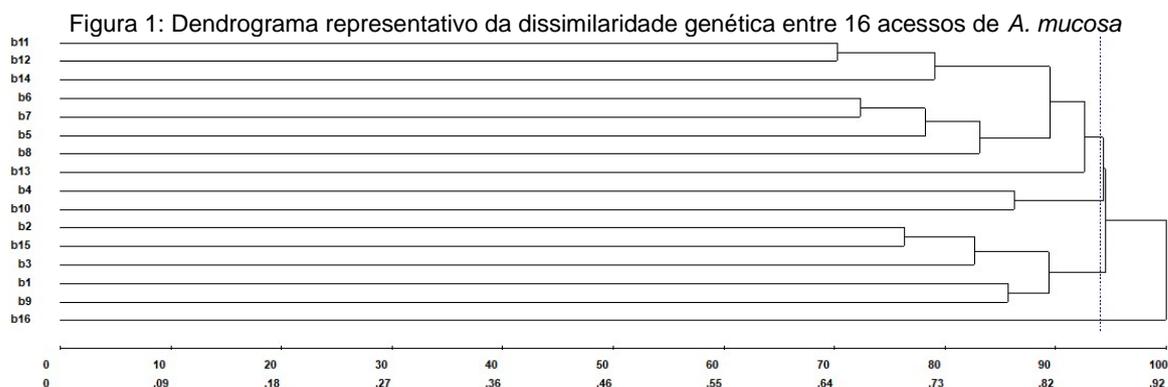
Os 12 primers que apresentaram bandas nítidas e bem definidas foram utilizados para a avaliação da diversidade genética dos 16 indivíduos selecionados.

O número de bandas amplificadas variou de 5 (LMCH53 e LMCH119) a 11 (LMCH33 e LMCH71), totalizando 102 bandas, as quais apresentaram 77,33% de polimorfismo.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) variaram de 0,155 (LMCH87) a 0,298 (LMCH29), com valor médio de 0,202.

De acordo com as informações das ampliações tabuladas na matriz binária foi possível estimar os valores de dissimilaridade entre os 16 indivíduos de biribá. Por meio do coeficiente de Jaccard, a menor dissimilaridade foi observada entre os indivíduos 11 e 12 (0,6471) e a maior foi entre os indivíduos 1 e 6 (1,0).

A matriz binária de dados obtidos permitiu a construção do dendrograma no qual as relações entre os indivíduos puderam ser verificadas a partir das ramificações da árvore obtida. Foi possível observar a formação de 4 grupos no dendrograma, com a distância média de 0,84 entre eles (Figura 1). O grupo G1 é composto por oito acessos (5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14), o grupo G2 com dois acessos (4 e 10), o grupo G3 é formado por cinco acessos (1, 2, 3, 9 e 15) e o G4 é formado por apenas um acesso (16).



Fonte: O Autor.

A fim de verificar a consistência do agrupamento dos indivíduos, foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de dissimilaridades genéticas e a matriz dos valores cofenéticos, sendo encontrado o valor de 67,37%, onde quanto mais elevada for a porcentagem, menor

será a distorção ao agrupar os indivíduos, a qual poderá ser obtida através do método de ligação média (UPGMA) (CRUZ *et al.*, 2004).

Os genótipos 1 e 6 (1,0) foram os que apresentaram uma maior dissimilaridade entre si pelo índice de Jaccard, reafirmado sua dissimilaridade pelo método de agrupamento UPGMA, onde se alocaram em grupos diferentes.

## Discussão

Os resultados obtidos indicam que a taxa de transferibilidade dos primers foi de 40%, valor similar ao encontrado por Lorenzoni (2016). A eficiência desta taxa é relativa, podendo variar para menores porcentagens, como encontrado no trabalho de Zucchi *et al.* (2002), (2,8%), ou maiores, como encontrado em Sirtoli *et al.* (2023) (89,47%). As falhas de amplificação dos demais primers pode ser explicada devido à divergência nas sequências que flanqueiam os SSRs criando, assim, alelos nulos (SMULDERS *et al.*, 1997).

Segundo Botstein *et al.* (1980), valores de PIC para marcadores SSR entre 0 e 0,25 são classificados como menos informativos, 0,25 a 0,5 moderadamente informativos e maiores de 0,5 a 1 são altamente informativos, indicando que os valores de PIC encontrados no presente estudo variaram de pouco para moderadamente informativos.

No trabalho foi calculado a dissimilaridade entre os indivíduos, onde como foi falado, a menor dissimilaridade foi observada entre os indivíduos 11 e 12 (0,6471) e a maior foi entre os indivíduos 1 e 6 (1,0). É importante verificar o índice de dissimilaridade de indivíduos devido as diferentes finalidades que cada genótipo possa ter, por exemplo, um material que pode ser utilizado para produzir frutos destinados ao comércio in natura pode apresentar características não desejáveis para materiais com finalidade de porta enxerto, sendo válido a aplicação desse índice na busca dessas diferentes aplicabilidades (KAVATI 1992; JUNQUEIRA *et al.* 1996; JUNQUEIRA *et al.* 2000; TOKUNAGA 2000; MANICA 2000; KAVATI e DONADIO, 2011). O coeficiente de Jaccard se baseia, essencialmente, na proporção das concordâncias positivas e negativas, o que permite a avaliação de uma ampla gama de semelhanças e fornece uma matriz consistente (JACCARD, 1901).

Variabilidade genética é essencial para programas de melhoramento genético de plantas e maior formação de grupos é de extrema importância para um banco de germoplasma (WAMSER *et al.*, 2011). Os dados obtidos permitem a visualização de possíveis combinações híbridas de maior efeito heterótico, o que, por sua vez, torna possível a obtenção de genótipos superiores nas gerações segregantes (CRUZ *et al.*, 2014). Além disso, os dados produzidos podem ser úteis na gestão e organização de bancos de germoplasma, pois permitem a identificação de genótipos altamente similares e duplicatas (NEIVA *et al.*, 2011).

## Conclusão

No presente estudo foi possível realizar a transferibilidade de marcadores desenvolvidos para *A. cherimola* em *A. mucosa*, os quais apresentaram polimorfismo e assim foi possível o estudo de diversidade genética entre os indivíduos de biribá, além de auxiliar programas de conservação e melhoramento dos recursos genéticos do país. Deste modo, os marcadores SSR apresentam potencial para transferibilidade, e permitiram avaliar a diversidade genética entre os acessos.

## Referências

BOTSTEIN, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms**. Am. Soc. Hum. Genet. 32, 314–331.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. Em: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 9–30.

COSSON, P.; DECROOQ, V.; REVERS, F. Development and characterization of 96 microsatellite markers suitable for QTL mapping and accession control in an *Arabidopsis* core collection. **Plant**

**methods**, v. 10, n. 1, p. 2, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24447639>. Acesso em: 02 de outubro 2023.

COSTA, E. V *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatteropsis species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1895–9, jun. 2008.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. Visconde do Rio Branco - MG: **Suprema**, 2011.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3 ed. Viçosa: UFV, v.1, 2004, 480p.

CRUZ CD (2013) **GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics**. Acta Sci 35(3): 271-276.

CRUZ, C.D.; REGAZZI AJ.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4ed. Editora UFV, Viçosa, 2014. 514p

DOYLE JJ, Doyle JL (1990) **Isolation of plant DNA from fresh tissue**.12:13-15.

FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. **Planaltina: Embrapa**, 2007, 102p.

FAN L, Zhang MY, Liu QZ (2013) Transferability of newly developed pear SSR markers to other Rosaceae species. **Plant Mol Biol Rep** 31(6):1271-1282.

FERREIRA MGR, Santos MRA, Silva EO, Gonçalves EP, Alves EU, Bruno RLA (2010) Emergência e crescimento inicial de plântulas de biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill) (*Annonaceae*) em diferentes substratos. **Semina: Cienc Agr** 31(2):373-380.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: **EMBRAPA; CENARGEN**, 1996. 220 p.

FONSECA, C. E. L.; RIBEIRO, J. F. Fruteiras do cerrado: estágio atual e perspectivas futuras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1., 1992, Cruz das Almas. Anais... Cruz das Almas: **Embrapa; CNPMF; SBF**, 1992. p. 63-75.

JACCARD, Paul. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bull Soc Vaudoise Sci Nat**, v. 37, p. 547-579, 1901.

JUNQUEIRA NTV, Oliveira MAS, Icuma IM, Vargas Ramos VH (1996) **Graviola para exportação: aspectos fitossanitários**. Brasília: MAARA – SDR EMBRAPA – SPI, 67p.

JUNQUEIRA NTV, Oliveira MAS, Ramos VHV, Pinto ACQ, Icuma IM (2000) **Controle de doenças da graviola no cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados.

KAVATI, R; DONADIO, LC (2011). **Biribá**. Jaboticabal: Funep, 15p.

KAVATI RO (1992) Cultivo da atemóia. In: Donadio LC, Martins ABG, Valente JP (Eds.) **Fruticultura tropical**. Jaboticabal: FUNEP, p.39-70.

LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético**. 2000.

LORENZONI, R. M. **Evidências cariotípicas e moleculares da hexaploidia em *Annona mucosa***. 2016. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

MANICA I (2000) **Frutas nativas, silvestres e exóticas 1**: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biribá, carambola, cereja-do-rio-grande, jabuticaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 327p.

MENDES-SILVA, I.; Lopes, JC; Silva, LV; Bazante, ML. ***Annona em Flora e Funga do Brasil***. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB110252>. Acesso em: 01 out. 2023.

NEIVA, I.P.; ANDRADE JÚNIOR, V.C.; VIANA, D.J.S.; FIGUEIREDO, J.A.; MENDONÇA FILHO, C.V.; PARRELLA, R.A.C.; SANTOS, J.B. Caracterização morfológica de acessos de batata-doce do banco de germoplasma da UFVJM, Diamantina. **Horticultura Brasileira** v.29, p. 537-541. 2011.

SANTOS CE, Roberto SR, Martins ABG (2005) Propagação do biribá (*Rollinia mucosa*) e sua utilização como porta-enxerto de pinha (*Annona squamosa*). **Acta Sci Agron** 27(3):433-436.

SIRTOLI, G. F. *et al.* **Transferibilidade de marcadores *ssr* de buva (*Conyza canadensis*) para capim-amargoso (*Digitaria insularis*)**. XXVII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica (XXVII INIC), 2023, Vale do Paraíba.

SMULDERS, M. J. M.; BREDEMEIJER, G.; RUS-KORTEKAAS, W.; ARENS, P.; VOSMAN, B. Use of short microsatellites from database sequence to generate polymorphism among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. **Theor Appl Genet** 97: 264–272. 1987.

TOKUNAGA T (2000). **A cultura da atemóia**. Campinas: CATI, Boletim Técnico 233, 80p

VARSHNEY, R, K.; THIEL, T.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; GRANER, A, *In silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7, p. 537-546, 2002.

WAMSER, G.H.; ARRUDA, B.; STINGHEN, J.C.; ROZZETTO, D.S.; BERTOLDO, J.G.; LANNES, S.D.; GUIDOLIN, A.F.; COIMBRA, J.L.M. Caracterização e estimativa da variabilidade genética de genótipos de cebola. **Horticultura Brasileira** v.30,p. 327-332. 2012.

ZUCCHI MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Brondani C (2002). **Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica*** (Myrtaceae family). *Mol Ecol Notes* 2:512-513.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelas bolsas e suporte financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa da coordenadora deste estudo. À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por possibilitar a realização dessa pesquisa.